

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE EDUCACIÓN
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA Y EDUCACIÓN AMBIENTAL

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE *Cordyceps* sp. (ASCOMYCOTA:
HYPOCREALES) AISLADO DE UNA PUPA DE MARIPOSA (INSECTA: LEPIDOPTERA) DEL
MARIPOSARIO AMARANTA DE COLOMBIA, PEREIRA, RISARALDA**

JOSÉ ALEJANDRO OSORIO POSADA

TATIANA SANJUAN, Ph.D.
Universidad de Antioquia
Directora

ARMENIA
JUNIO DE 2018

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	4
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
3. OBJETIVOS	6
3.1. OBJETIVO GENERAL	6
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
4. JUSTIFICACIÓN	7
5. MARCO TEÓRICO.....	7
5.1. DEFINICIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.....	7
5.2. ECOLOGÍA DE <i>CORDYCEPS</i>	8
5.3. SISTEMÁTICA Y TAXONOMÍA DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS CON ÉNFASIS EN <i>CORDYCEPS</i>	9
5.4. IDENTIFICACIÓN DE <i>CORDYCEPS</i>	11
5.5. AISLAMIENTO Y CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	11
5.6. LA LUZ VISIBLE DURANTE EL CRECIMIENTO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	12
5.7. LA PIGMENTACIÓN EN <i>CORDYCEPS</i>	13
5.8. EL USO DE <i>CORDYCEPS</i> COMO CONTROLADORES BIOLÓGICOS.....	15
5.9. <i>CORDYCEPS</i> Y SU UTILIDAD EN LA MEDICINA TRADICIONAL	15
5.10. <i>CORDYCEPS</i> EN LA CRIANZA DE MARIPOSAS	16
6. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	17
7. METODOLOGÍA	17
7.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA Y CARACTERÍSTICAS AMBIENTALES DEL MARIPOSARIO	17
7.2. RECOLECCIÓN DE <i>CORDYCEPS</i> SP.....	17
7.3. AISLAMIENTO DE <i>CORDYCEPS</i> SP.....	18
7.4. CONDICIONES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>CORDYCEPS</i> SP.	18
7.5. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>CORDYCEPS</i> SP.	22
7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
8. RESULTADOS.....	24
8.1. MORFOLOGÍA DE <i>CORDYCEPS</i> SP.	24
8.2. PIGMENTACIÓN DE <i>CORDYCEPS</i> SP.....	25
8.3. DENSIDAD Y TEXTURA MICELIAL DE <i>CORDYCEPS</i> SP.	32
8.4. CRECIMIENTO RADIAL DE <i>CORDYCEPS</i> SP.	39

9. DISCUSIÓN.....	45
9.1. MORFOLOGÍA DE <i>CORDYCEPS</i> SP.	45
9.2. PIGMENTACIÓN DE <i>CORDYCEPS</i> SP.....	46
9.3. CRECIMIENTO MICELIAL DE <i>CORDYCEPS</i> SP.	49
10. CONCLUSIONES.....	53
11. RECOMENDACIONES	53
12. AGRADECIMIENTOS	54
13. BIBLIOGRAFÍA.....	55
14. ANEXOS.....	62

1. RESUMEN

Los hongos entomopatógenos del género *Cordyceps sensu lato* son reconocidos como fuentes potenciales para el control biológico de insectos plagas, producción de metabolitos de importancia medicinal y para la obtención de colorantes naturales. La caracterización morfológica y la evaluación de su cultivo son los primeros pasos que permiten la identificación de especie y su manejo. La luz y el sustrato en que crecen estos hongos son factores importantes que afectan su desarrollo y producción. La morfología y los efectos de la luz y diferentes medios de cultivo se evaluaron durante el crecimiento micelial *in vitro* de un estado conidiogénico de *Cordyceps* sp., de coloración anaranjado intenso a rojo que se encontró hospedando en crisálidas de lepidópteros de un mariposario. Las colonias del hongo se incubaron a 27 ± 2 °C durante ocho semanas bajo condiciones de luz visible y oscuridad constantes en diecisiete medios, algunos suplementados con integumento de pupa de lepidópteros, y se comparó el desarrollo de la pigmentación, la densidad y textura micelial, y la tasa de crecimiento diametral. La pigmentación fue intensa en las colonias que crecieron bajo condición constante de luz que aquellas dispuestas en oscuridad siendo indiferente la composición nutricional del medio. La densidad y la textura micelial fueron moderada a abundante y semialgodonosa a algodonosa respectivamente para casi todos los medios en ambas condiciones, excepto en aquellos que contenían bajas concentraciones de carbono y que presentaron una densidad pobre y textura lisa. La tasa de crecimiento diametral (mm/semana) en función de las condiciones de luz y oscuridad y del medio de cultivo se ajustó a un modelo lineal ($y=a+bx$) con un rápido crecimiento de las colonias cultivadas bajo oscuridad; sin embargo, el integumento también favoreció el crecimiento en los medios que se suplementaron con éste. Las características morfológicas y de cultivo de *Cordyceps* sp. se acercan a las especies *C. amoenerosea* y *C. catenibliqua*; y se concluye que hay diferencias significativas entre las condiciones de luz y oscuridad constantes principalmente, y luego entre medios, que pueden utilizarse de acuerdo al propósito de producción micelial de *Cordyceps* sp.

Palabras claves: *Cordyceps*, morfología, luz, medio de cultivo, pigmentación, crecimiento.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Colombia es reconocida mundialmente por su alta diversidad de especies vegetales y animales gracias a sus condiciones ambientales particulares, en cuyo caso los insectos contribuyen con una significativa proporción (Villareal et al., 2004). Lo anterior hace pensar que existe igualmente un amplio potencial en la diversidad de la microbiota asociada a esta región y a los insectos que no ha sido apreciada, la cual se debería estudiar con el objeto de poder darle un valor agregado, particularmente en el marco de la caracterización, identificación, manejo, conservación y utilidad de cepas nativas de hongos entomopatógenos (Mena, 2011; Sanjuan, 2014; Sanjuan et al., 2015).

Con hongos entomopatógenos, productos agrícolas a base de *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* se han empleado exitosamente como controladores de insectos plagas (Vega et al., 2012; Jaronski, 2014; Hajek y Meyling, 2018). Relacionados con estos hongos bio-insecticidas, los cuales son las formas asexuales del género *Cordyceps sensu lato* (s. l.) (Ascomycota: Hypocreales), se encuentran algunas especies que son utilizadas como nutracéuticos en Asia. El hongo tibetano *Ophiocordyceps sinensis* conocido como “Yartsa Gunbu” se ha usado en la medicina tradicional China como vigorizante y para tratar desórdenes hepáticos desde el siglo XVIII (Mizuno, 1999; Zhou et al., 2009; Lo et al., 2013). Otra especie utilizada es *Cordyceps tenuipes*, el cual es un alimento tradicional muy apreciado en Corea y se conoce como “Snow-Flakes” siendo un suplemento dietario por su gran contenido de proteínas y nucleósidos (Hong et al., 2007). Esta utilidad de los hongos entomopatógenos pone en manifiesto que la comprensión biológica, colección y el aprovechamiento de estos microorganismos constituyen una herramienta viable y en teoría de bajo riesgo para el hombre y el medio ambiente.

En Colombia, se han hecho estudios sobre la diversidad de *Cordyceps s. l.* y se ha encontrado que muchas especies poseen asociaciones con un rango específico de hospederos que las hacen únicas, pudiendo ser potencialmente útiles en control biológico y en la medicina (Sanjuan, 2014; Sanjuan et al., 2015; Castillo et al., 2018). En los departamentos del Quindío y Risaralda, Sanjuan (2014), y Castillo et al., (2018), aislaron de los mariposarios del Jardín Botánico del Quindío y Amaranta de Colombia, la especie *Cordyceps tenuipes* en su estado asexual (= *Isaria tenuipes*) de larvas y pupas de mariposas infectadas. Esta especie de hongo entomopatógeno produjo una epizootia en grandes proporciones que puso en riesgo la viabilidad de varias especies de mariposas y al descubierto la falta de conocimiento que se

tiene sobre estos patógenos y las condiciones zoonosanitarias que hay que manejar para evitar estos episodios (Sanjuan, 2014; Castillo et al., 2018).

Sin embargo, en el mariposario Amaranta de Colombia ubicado en Pereira, Risaralda, se han presentado pupas de mariposas con micosis de características morfológicas diferentes a las reportadas por Sanjuan, (2014), y Castillo et al., (2018). Por tal razón, se hizo necesario caracterizar morfológicamente el patógeno que se está hallando en dicho mariposario con el fin de establecer más adelante las recomendaciones para que los procesos de crianza no se vean afectados por epizootias con este hongo entomopatógeno, además de proporcionar información acerca de su estatus taxonómico y crecimiento *in vitro*, preservar cepas nativas para su colección y posteriormente poder evaluar su valor biotecnológico.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Describir las características morfológicas del hongo entomopatógeno *Cordyceps* sp. (Ascomycota: Hypocreales) con cultivo en diferentes medios sólidos y en condiciones de luz y oscuridad constantes aislado de una pupa de mariposa infectada (Insecta: Lepidoptera) hallado en el mariposario Amaranta de Colombia, Pereira, Risaralda.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar macro y microscópicamente la morfología de *Cordyceps* sp. a partir de la pupa de la mariposa hospedera recolectada en el mariposario Amaranta de Colombia.

Caracterizar microscópicamente la morfología de *Cordyceps* sp. cultivado en medio sólido.

Caracterizar el crecimiento micelial de *Cordyceps* sp. en varios medios de cultivo sólidos con diferentes periodos de incubación bajo condiciones de luz y oscuridad constantes.

4. JUSTIFICACIÓN

Más allá de su esencial función ecológica como recicladores de carbono y nitrógeno, los hongos pueden ser aprovechados para nuestro beneficio de diferentes maneras: como descomponedores primarios en producción de biocombustibles (Schuster y Schmoll, 2010), productores de metabolitos de importancia medicinal (Molnár et al., 2010; Lin y Li, 2011; Yue et al., 2012), agentes de control microbiológico de plagas agrícolas (Jaronski, 2014; Butt et al., 2016; Hajek y Meyling, 2018), productores de pigmentos naturales de utilidad industrial (Mata-Gómez et al., 2014; Dufossé et al., 2014; Gmoser et al., 2017), y no de menor valor como alimento y fermentadores de bebidas (Bourdichon et al., 2012). El impacto desfavorable de los hongos es igualmente múltiple y significativo, esto incluye su función como patógenos contaminantes de cultivos en la agricultura y zoocriaderos, su función como patógeno oportunista en humanos, y actualmente su función ecológica en la reducción de ciertas poblaciones de murciélagos y anfibios (Rosenblum et al., 2010; Foley et al., 2011).

Particularmente, los estudios en hongos entomopatógenos son de alto interés debido a su valor medicinal, a su potencial como agentes de biocontrol en insectos plagas, por las enfermedades y epizootias que causa en ambientes naturales y artificiales (zoocriaderos) en insectos benéficos, y para la producción de pigmentos naturales con aquellos que presentan coloraciones intensas. En una era de la bioeconomía, comprender la biología permitirá darle dicho valor agregado siendo el primer paso la recolección, aislamiento, caracterización, identificación y propagación de estos microorganismos. En adición, la caracterización del cultivo *in vitro* de *Cordyceps* sp. permitirá en el futuro potenciar la producción de ciertos caracteres fenotípicos que sean necesarios para su aplicabilidad biotecnológica.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Definición de los Hongos Entomopatógenos

Los hongos son heterótrofos, eucariotas, como tal son incapaces de fijar carbono libre, y por lo tanto tienen que absorber los compuestos orgánicos de otros organismos como fuente primaria de energía. Ellos logran esto como saprobios, parásitos en animales, plantas, y sobre

otros hongos, y con asociaciones mutualistas como líquenes, micorrizas, y endófitos (Alexopoulos et al., 1996; Webster y Weber, 2007; Vega et al., 2012).

Estructuralmente, los hongos tienen cuerpos filamentosos, tubulares, ramificados y a veces compartimentalizados llamados hifas, y una masa o tejido de hifas es colectivamente conocida como micelio. Una forma diferente de crecimiento de los hongos es exhibida por las levaduras, organismos unicelulares que se dividen asexualmente. Dependiendo de las condiciones ambientales, muchos hongos pueden exhibir ambas formas de crecimiento (es decir, como hifa y levadura), en ese caso son definidos como dimórficos. Los hongos entomopatógenos son considerados dimórficos porque tienen una fase levaduriforme dentro del insecto y otra macromicete formando ascomas visibles cuando se reproducen (Vega et al., 2012; Hajek y Meyling, 2018).

Los hongos entomopatógenos juegan un papel importante como agentes consumidores y reguladores de las poblaciones de insectos en los ecosistemas. Son microorganismos que invaden, se desarrollan dentro de los insectos y se propagan para infectar a otros cercanos ocasionando muertes, micosis, y epizootias, convirtiéndose así en agentes patógenos especialistas (Vega et al., 2012; Sanjuan et al., 2015; Butt et al., 2016; Hajek y Meyling, 2018; Castillo et al., 2018).

5.2. Ecología de *Cordyceps*

Los hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* son cosmopolitas y ubicuos, pero la mayoría de las especies se encuentran concentradas en los bosques tropicales y más si estos son extensos, primarios y lluviosos, y está relacionado con la alta diversidad de entomofauna que se encuentra en esos lugares (Vega et al., 2012; Sanjuan, 2014; Sanjuan et al., 2015; Shrestha et al., 2016; Hajek y Meyling, 2018). Dentro del hábitat, generalmente se ubican en el sotobosque por el suelo, hojarasca, raíces de árboles, leños en descomposición, o en las estructuras basales o elevadas de las plantas, exhibiendo casi siempre al exterior sólo los cuerpos fructíferos (Sanjuan et al., 2001; Vega et al., 2012; Sanjuan, 2014; Sanjuan et al., 2015; Shrestha et al., 2016).

El proceso de infección implica la adhesión de la espora a la cutícula, seguida por la germinación, penetración del integumento, y la diseminación interna por todo el cuerpo para manipular el comportamiento del insecto y colapsar su sistema inmune hasta su muerte después de poco tiempo. Durante este proceso, que puede involucrar la producción de metabolitos secundarios, los órganos internos del hospedero son eventualmente

degradados. Finalmente, las hifas del hongo emergen al exterior del cadáver del insecto dando lugar a los cuerpos fructíferos y la esporulación (Vega et al., 2012; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013; Boomsma et al., 2014; Butt et al., 2016; Hajek y Meyling, 2018).

Cordyceps exhibe ciclos de vida complejos porque son pleomórficos; es decir, las especies experimentan dos fases morfológicamente distintas que incluyen los estados sexual reproduciéndose con ascosporas (teleomórfico o meiospórico), y el asexual reproduciéndose con conidios (anamórfico o mitospórico); esto implicó la adaptación y desarrollo de diferentes estructuras asociadas o cuerpos fructíferos para cada estado y siendo esto la clave en la identificación de especies (Kobayasi, 1941; Mains, 1958; Sung et al., 2007; Vega et al., 2012).

Naturalmente, factores ambientales como la luz, temperatura, y humedad también influyen en la eficacia de infección y desarrollo de los hongos entomopatógenos (Vega et al., 2012; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013; Butt et al., 2016; Hajek y Meyling et al., 2018).

5.3. Sistemática y Taxonomía de los Hongos Entomopatógenos con Énfasis en *Cordyceps*

La diversidad de hongos entomopatógenos oscila entre 750 – 1000 especies ubicadas en 100 géneros distribuidos en los órdenes Hypocreales y Onygenales (Ascomycota), Entomophthorales y Neozygitaes (Entomophthoromycota), a pesar de esto, con el desarrollo de las herramientas moleculares se han descubierto especies que son crípticas y otras que hacen parte de una conexión anamorfo–teleomorfo, por lo que disminuiría este número (Vega et al., 2012; Boomsma et al., 2014; Shrestha et al., 2016, 2017; Hajek y Meyling, 2018), aunque la totalidad de la diversidad de hongos entomopatógenos es completamente desconocida (Vega et al., 2012; Shrestha et al., 2016; Hajek y Meyling, 2018).

El modo de reproducción pleomórfico de los Ascomicetos ha causado algunos de los desafíos taxonómicos más complejos en la actualidad. Tradicionalmente, cada una de las entidades morfológicas descritas le fue asignado un nombre científico diferente conllevando a una nomenclatura dual para el mismo organismo (Sung et al., 2007; Kepler et al., 2017; Hajek y Meyling, 2018). Desde el año 2012, siguiendo la revisión del artículo 59 del Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (International Code of Nomenclature, ICN), y basado en caracterizaciones moleculares y filogenéticas, la nomenclatura dual de los hongos pleomórficos fue abandonada formalmente y sólo es permitido un nombre genérico para representar a ambos estados bajo la norma Un Hongo = Un Nombre

(One Fungus = One Name, 1F = 1N) (Sung et al., 2007; McNeill et al., 2012; Kepler et al., 2017; Shrestha et al., 2017; Hajek y Meyling, 2018).

El género más diverso e importante de los hongos entomopatógenos es *Cordyceps* Fr. 1883 (Ascomycota: Hypocreales) (Vega et al., 2012; Hajek y Meyling, 2018). *Cordyceps sensu lato* (s. l.) posee más de 400 especies descritas dentro de varios géneros y clasificadas en las familias Clavicipitaceae, Ophiocordycipitaceae y Cordycipitaceae (Sung et al., 2007; Shrestha et al., 2014, 2016, 2017). La familia Cordycipitaceae posee al género *Cordyceps* teniendo cerca de 70 especies y haciendo referencia a las especies consideradas como *Cordyceps sensu stricto* (s. s.) (Sung et al., 2007; Shrestha et al., 2014, 2017; Hajek y Meyling, 2018). En este género, su forma anamórfica o conidiogénica nombrada tradicionalmente como *Isaria* posee casi 50 especies descritas que parasitan especialmente a los órdenes Hemiptera, Coleoptera y Lepidoptera (Samson, 1974; Luangsa-ard et al., 2004, 2005; Humber, 2012; Vega et al., 2012; Shrestha et al., 2016).

El uso del taxón *Isaria* ha variado mucho sistemáticamente a través del tiempo, y este ha sido combinado y reajustado con los nombres de sus teleomorfos o estados sexuales bajo la regla 1F = 1N a sólo uno para representar los dos estados. Así, hongos que fueron llamados antes *Isaria tenuipes*, *I. cateniobliqua* e *I. amoenerosea* son llamados actualmente *Cordyceps tenuipes*, *C. cateniobliqua* y *C. amoenerosea*, respectivamente (Sung et al., 2007; Vega et al., 2012; Kepler et al., 2017; Hajek y Meyling, 2018).

Los estados conidiogénicos isariformes de *Cordyceps* s. s. se caracterizan por poseer hifas aparentemente hialinas, formando micelio y sinemas de colores brillantes como rojo, amarillo y rosado; los conidióforos son ramificados soportando fiálides verticiladas en forma de botella; los conidios pueden ser también hialinos y de formas diferentes, todo esto les dan un aspecto pulverulento blanco (Samson, 1974; Luangsa-ard et al., 2004, 2005; Humber, 2012). Las especies de *Cordyceps* isariformes más estudiadas desde el punto de vista morfológico, fisiológico y molecular son *C. farinosa*, *C. fumosorosea* y *C. tenuipes*, esta última recientemente asociado a su teleomorfo *Cordyceps takaomontana* y llevando este nombre para los dos estados del hongo en los últimos años (Luangsa-ard et al., 2005; Sung et al., 2007; Humber, 2012; Vega et al., 2012); sin embargo, Kepler et al., (2017) reajustó su nombre por el de *Cordyceps tenuipes*. Los estudios en *Cordyceps* isariformes son escasos si se comparan con otros semejantes como *Metarhizium* y *Beauveria*, los hongos entomopatógenos más utilizados en el control biológico de insectos (Vega et al., 2012; Jaronski, 2014; Butt et al., 2016; Hajek y Meyling, 2018).

5.4. Identificación de *Cordyceps*

La mayoría de los hongos entomopatógenos pueden ser fácilmente identificados con el reconocimiento directo del hospedero y con la preparación de una placa para observación con el microscopio de sus estructuras reproductivas deduciendo el arreglo con que éstas se encuentren (Samson, 1974; Humber, 2012). Las estructuras reproductivas en *Cordyceps* son los estromas, peritecios, ascos y ascosporas para individuos con estado teleomórfico; sinemas, conidióforos, fiálides, y conidios para los estados anamórficos (Humber, 2012).

La identificación de *Cordyceps* también se puede lograr con las características morfológicas que desarrollen las colonias de su aislamiento y cultivo *in vitro* (Humber, 2012). El aislamiento y cultivo del hongo se obtiene usando el medio sólido apropiado y teniendo en cuenta factores ambientales como la temperatura y la humedad (Inglis et al., 2012; Jaronski y Jackson, 2012). Otro factor importante pero tenido menos en cuenta es la luz. La luz influye en el desarrollo de las características morfológicas como la pigmentación del micelio, aspectos de las colonias en cultivo y la presencia o ausencia de otras estructuras propias de cada especie. Las colonias cultivadas bajo iluminación son a menudo bastante diferentes de las cultivadas en total oscuridad. Las colonias iluminadas tienden a ser más pigmentadas, tienen menos micelio aéreo, y pueden tener diámetros grandes o pequeños en comparación con las cultivadas en oscuridad (Leach, 1971; Valadon, 1976; Shrestha et al., 2006; Inglis et al., 2012; Dong et al., 2013; Chiriví et al., 2017).

5.5. Aislamiento y Cultivo en Medio Sólido de los Hongos Entomopatógenos

La mayoría de los hongos entomopatógenos son aislados y propagados en medios sólidos de cultivo que contengan principalmente fuentes de carbono y nitrógeno sustituyentes al de los insectos para facilitar su obtención y estudio *in vitro*. Comúnmente se utilizan los medios PDA (extracto de papa, dextrosa y agar), MA (extracto de malta y agar), SDA (Sabouraud, dextrosa y agar), SDYA (Sabouraud, dextrosa, extracto de levadura y agar), y medios naturales realizados con cereales como agar avena (OA), arroz integral (BR), cebada, y centeno (Inglis et al., 2012; Vega et al., 2012; Mar et al., 2012; Jaronski, 2014; Chiriví et al., 2017). Además de las fuentes de carbono y nitrógeno, las sales minerales, elementos trazas como el hierro y el calcio, y vitaminas pueden ser añadidos pero no son esenciales para el crecimiento de los hongos entomopatógenos (Jaronski y Jackson, 2012).

Sin embargo, el tipo de medio de cultivo afecta el desarrollo fenotípico de los hongos entomopatógenos de acuerdo a cada especie o cepa de la especie, y es debido a la variedad y concentración de sus componentes nutritivos y exigencias nutricionales del hongo, por lo que se hace conveniente la evaluación y elección del medio óptimo o completo para el estudio de un hongo en particular (Shrestha et al., 2006; Cabanillas y Jones, 2009; Humber, 2012; Inglis et al., 2012; Jaronski, 2014; Chiriví et al., 2017).

La producción de hongos también es influenciada por una variedad de factores, algunos de los cuales son innatos o genéticos y de difícil manipulación, mientras que otros son de naturaleza ambiental y fácilmente controlados. Generalmente, los medios poseen un pH entre 4 – 7, y los cultivos se ponen en una incubadora con temperaturas cercanas a los 25 °C y humedad relativa del 80 % (Cabanillas y Jones, 2009; Inglis et al., 2012; Jaronski y Jackson, 2012; Jaronski, 2014). De los factores ambientales, la luz es particularmente efectiva para mejorar la producción en muchos hongos, pero actualmente es poco estudiado (Leach, 1971; Shrestha et al., 2006, Sung et al., 2010; Inglis et al., 2012; Dong et al., 2012, 2013).

Para el caso de la mayoría de las especies de *Cordyceps*, diferentes tipos de medio sólido son usados para su aislamiento y cultivo, pero se le ha dado poca importancia a la concentración de sus nutrientes con relación a su desarrollo en intervalos de tiempo por periodos largos de incubación. De ahí, que es de interés científico además de aplicado estudiar las características de cultivo de estos hongos en un rango de nutrición de pobre ha enriquecido y por periodos de incubación (Shrestha et al., 2006).

5.6. La Luz Visible Durante el Crecimiento de Hongos Entomopatógenos

La luz es una de las muchas señales físicas que los hongos aprovechan para percibir e interactuar con su hábitat. En contraste con las plantas, los hongos usan la luz como una fuente de información y no como una fuente de energía (Tisch y Schmoll, 2010; Rangel et al., 2011; Heintzen, 2012; Fuller et al., 2016).

Tres sistemas sensitivos a la luz conformados por proteínas han sido descritos en hongos: (1) el sistema sensible a la luz ultravioleta y azul (400-490 nm), realizado por un cromóforo vinculado al dominio flavina denominado LOV (luz, oxígeno, voltaje); (2) el sistema sensible a la luz azul-verde (495-570 nm), llevado a cabo por las rodopsinas que son contenidas en las membranas plasmáticas; y (3) el sistema sensible a la luz roja (600-850 nm), captado por fitocromos fotoreceptores a través de un cromóforo tetrapírol lineal (Rangel et al., 2011; Heintzen, 2012; Fuller et al., 2014; Fuller et al., 2016; Oliveira et al., 2018). Recientemente, los

criptocromos de los hongos fueron asociados con la sensibilidad a la luz azul (Heintzen, 2012; Fuller et al., 2016).

Dichas proteínas fotoreceptoras detectan la luz y transmiten la señal a la hifa en tres pasos: (1) el cromóforo absorbe un fotón y sufre un cambio fisicoquímico o estructural; (2) una interacción establecida entre el cromóforo y la proteína conduce a un cambio estructural sobre la segunda; (3) la proteína transmite la señal por virtud de alguna actividad bioquímica (generalmente enzimas) o por una interacción molecular establecida (proteína-proteína, proteína-ADN) (Fuller et al., 2016).

La luz visible (radiación electromagnética con longitudes de onda entre 380-750 nm) durante el crecimiento micelial influye en: (1) en el metabolismo primario y secundario (Shrestha et al., 2005, 2006; Tisch y Schmoll, 2010; Dong et al., 2013; Fuller et al., 2016); (2) en el desarrollo celular y morfogénico (Shrestha et al., 2005; Yang y Dong, 2014; Fuller et al., 2016); (3) en el fototropismo (Tisch y Schmoll, 2010); y en la virulencia de hongos patógenos (Rangel et al., 2011; Fuller et al., 2016; Oliveira et al., 2018).

La mayoría de estas proteínas fotoreceptoras y su funcionamiento fueron caracterizados especialmente sobre los hongos ascomicetos *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus nidulans*, y *A. fumigatus*, que son las especies modelos para el estudio de la fotobiología de hongos (Heintzen, 2012; Fuller et al., 2016).

Los efectos observables de la luz sobre los hongos son la inducción o inhibición en el desarrollo de las estructuras reproductivas, la producción de pigmentos, la cantidad y tipo de micelio, y en el crecimiento radial; teniendo en cuenta la intensidad y tiempo de exposición (Shrestha et al., 2006; Tisch y Schmoll, 2010; Dong et al., 2012, 2013).

5.7. La Pigmentación en *Cordyceps*

Cordyceps s. l. produce diferentes tipos de pigmentación como verde, amarillo, anaranjado, rojo, marrón, negro, etc, que es característico en cada especie (Isaka et al., 2003; Shrestha et al., 2005, 2006; Sung et al., 2007, 2010; Lu et al., 2013; Chiriví et al., 2017). Sin embargo, especies como *Cordyceps militaris* puede presentar tonalidades diferentes de pigmentación que van desde amarillo a anaranjado intenso dependiendo del sustrato y de los factores ambientales en el que se desarrolle, además del estado fisiológico, la cepa, y la edad de este (Cho et al., 2002; Shrestha et al., 2005, 2006; Dong et al., 2013; Mata-Gómez et al., 2014; Costa et al., 2016),

La pigmentación de *Cordyceps* es reportada a ser debida principalmente por la presencia de carotenoides (Shrestha et al., 2005; Dong et al., 2013). Ellos son metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de los terpenos y comprenden más de 600 pigmentos orgánicos, divididos en dos clases: xantófilas (que contienen oxígeno) y carotenos (que no contienen oxígeno). Estos pigmentos generalmente absorben luz azul y pueden actuar como antioxidantes. Además de su función protectora para los organismos que las producen, estas moléculas también proporcionan efectos benéficos para los animales que la consumen, incluyendo el humano (Stahl y Sies, 2005). Mientras las rutas biosintéticas de los carotenoides son bastante conservadas, la regulación en la producción es más variable entre especies y cepas de la misma especie (Shrestha et al., 2005; Almeida y Cerda-Olmedo, 2008; Tisch y Schmoll, 2010) y su acumulación a menudo depende de la calidad y tiempo de exposición a la luz, y la nutrición (Cho et al., 2002; Shrestha et al., 2005, 2006; Dong et al., 2013); por tal razón, investigaciones realizadas en la caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica con especies de *Cordyceps* se recomienda evaluarlas en perfiles de luz/oscuridad con cultivo en diferentes medios (Cho et al., 2002; Shrestha et al., 2005, 2006).

Otros pigmentos no carotenoides presentes en las especies de *Cordyceps s. l.* son las melaninas (melanina dihidroxinaftaleno, un complejo agregado de poliquétidos), flavinas (riboflavinas), fenazinas, y quinonas (antraquinonas, naftaquinonas, y azaflonas) (Isaka et al., 2003; Dufossé et al., 2014; Costa et al., 2016; Gmoser et al., 2017). Los estromas de *Beauveria bassiana* producen pigmento amarillo o anaranjado brillante durante su desarrollo natural o cultivado bajo los efectos de la luz debido a los poliquétidos tenelina, bassianina y oosporeína, que son encontrados también en su estado anamorfo, y otras especies del mismo género, pero a estos proporcionándole una coloración amarillo claro (El-Basyouni et al., 1968; Wat et al., 1977; Molnár et al., 2010; Hyun et al., 2013). *Ophiocordyceps unilateralis* produce seis naftaquinonas que le da una coloración de rojo intenso a púrpura al micelio y cuerpos fructíferos dependiendo del pH del sustrato en que crezca (Kittakoop et al., 1999; Isaka et al., 2003; Unagul et al., 2005; Molnár et al., 2010; Gmoser et al., 2017). Seis antraquinonas, paeciloquinonas A-F, fueron aisladas de *Metarhizium carneum*, un hongo de micelio rosado (Fredenhagen et al., 1995; Petersen et al., 1995; Isaka et al., 2003). En *Lecanicillium* spp. (= *Verticillium* spp.), con pigmentación amarillo pálido en el micelio, aislaron ocho antracenos, ES-242s, igualmente los aislaron en *Cordyceps pseudomilitaris*, un hongo con micelio rojo intenso a púrpura (Isaka et al., 2001; Isaka et al., 2003; Molnár et al., 2010; Chiriví et al., 2015).

5.8. El Uso de *Cordyceps* como Controladores Biológicos

Los primeros estudios con hongos patógenos de insectos fueron llevados a cabo en los años 1800s, y estos se concentraban en desarrollar formas para el manejo de las enfermedades que fueron devastadoras en la industria del gusano de seda. De hecho, la teoría del germen fue primero demostrado por Bassi en 1835 usando gusanos de seda y el hongo muscardino, que más tarde fue llamado *Beauveria bassiana* en honor al investigador. La idea de usar estos hongos para el manejo de insectos plagas llegan en gran parte por dicho estudio. Sin embargo, estos primeros intentos fueron pronto opacados por el desarrollo de los insecticidas químicos (Goettel et al., 2010; Vega et al., 2012; Jaronski, 2014). Según Goettel et al. (2010) y Jaronski (2014), hoy día existen más de 100 productos comerciales aprobados legalmente basados en hongos entomopatógenos impulsados por la nocividad biológica descubierta hace poco por parte de los insecticidas químicos.

El desarrollo comercial de los hongos entomopatógenos ha sido dirigido principalmente, en su orden, a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*, todos ellos estados anamórficos de *Cordyceps* s. l. Del género *Isaria* sobresalen las especies *I. fumosorosea* e *I. farinosa*. Una característica común de estos hongos que los hace atractivos de investigación es su virulencia, ya que las infecciones son logradas externamente por contacto de los conidios con sus hospederos y no requieren de su digestión, además de que un individuo puede liberar una gran cantidad de conidios capaces de germinar en pocas horas, o pueden mantenerse en el suelo como micelio por un periodo largo de tiempo o en las plantas como endófitos como una forma de conservación mientras infecta a su hospedero (Shrestha et al., 2006; Hesketh et al., 2010; Vega et al., 2012; Jaronski, 2014; Hajek y Meyling, 2018).

5.9. *Cordyceps* y su Utilidad en la Medicina Tradicional

Cordyceps también ha sido conocido y usado como un medicamento tradicional desde hace 500 años, primero en China y luego en los demás países orientales; y como producto nutracéutico fue introducido a la comunidad occidental durante el siglo XVII (Yue et al., 2012).

Cordyceps posee varios principios activos como suplemento químico para el beneficio de la salud humana, especialmente en las personas en convalecencia y en edad senil. Estudios han demostrado que los componentes bioactivos extraídos de *Cordyceps* tales como cordycepina, ácido cordycépico, beauvericina, ergosteroles, polisacáridos, nucleósidos y péptidos poseen un amplio rango de acciones farmacológicas como antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales,

antihiperlipidémicas, antiapoptóticas, inmunomoduladoras, nefroprotectoras, hepatoprotectoras, citotóxicas, y antibióticas (Mizuno, 1999; Ng y Wang, 2005; Hong et al., 2007; Zhou et al., 2009; Lin y Li, 2011; Yue et al., 2012; Tuli et al., 2014; Zhao et al., 2014; Chiriví et al., 2017; Nie et al., 2018; Olatunji et al., 2018).

5.10. *Cordyceps* en la Crianza de Mariposas

En los procesos de crianza de los mariposarios es posible encontrar desde individuos afectados esporádicamente hasta epizootias ocasionadas por hongos entomopatógenos, especialmente por los estados conidiogénicos de *Cordyceps s. l.* como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps farinosa*, *C. fumosorosea*, y *C. tenuipes* (Valencia et al., 2005; Montero, 2007; Mulanovich, 2007; Morales-Ramos et al., 2014; New, 2014; Sanjuan, 2014; Castillo et al., 2018). Dada la importancia educativa, conservacionista y económica que se le dan a los mariposarios en Colombia por ser este un país con alta diversidad de lepidópteros, se recomienda la eficiencia en la reproducción de mariposas atendiendo todos sus aspectos biológicos, en este caso los patológicos (Valencia et al., 2005; Montero, 2007; Mulanovich, 2007; Morales-Ramos et al., 2014; New, 2014; Castillo et al., 2018).

Recientemente, con el reporte de las epizootias ocasionadas por *C. tenuipes* en los mariposarios del Jardín Botánico del Quindío en el departamento del Quindío y Amaranta de Colombia en el departamento de Risaralda, sobre larvas en último instar y pupas de varias especies de lepidópteros, se llega a una visión diferente de control biológico con el hongo, siendo este la amenaza de un cultivo (Sanjuan, 2014; Castillo et al., 2018), revalidando una vez más la importancia en la investigación de estos microorganismos patógenos y la evasión de sus enfermedades en zoocriaderos.

La búsqueda de medidas zoosanitarias en la cría de insectos con especial énfasis en los efectos controladores causados por los hongos entomopatógenos se extienden hoy en día a la industria del gusano de seda *Bombyx mori*, y también a la cría de cualquier insecto en cautiverio, o simplemente en la conservación de insectos benéficos con sus ciclos de vida en condiciones naturales (New, 2009; Samways et al., 2010; Morales-Ramos et al., 2014; New, 2014; Castillo et al., 2018).

6. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación fue de tipo descriptivo y experimental, debido a que fue una caracterización morfológica *in vivo* e *in vitro* con varios tratamientos comparados sobre el crecimiento del hongo entomopatógeno *Cordyceps* sp. aislado de una pupa de mariposa infectada del mariposario Amaranta de Colombia.

7. METODOLOGÍA

7.1. Ubicación Geográfica y Características Ambientales del Mariposario

El mariposario Amaranta de Colombia está ubicado en una zona con perturbación agrícola de la vereda La Elvira, sector Huertas, dentro de la jurisdicción de la ciudad de Pereira del departamento de Risaralda, Colombia, con coordenadas latitudinal 04°46'05.47" N y longitudinal 75°41'38.03" O, y un total de 4 Ha. El área del mariposario es rural, se encuentra en la zona de vida Bosque Húmedo Premontano (bh-PM) caracterizada por poseer una temperatura promedio de 22 °C, una precipitación media anual de 2108 mL, humedad relativa del 79 %, y una altitud de 1508 msnm (CARDER 2013).

7.2. Recolección de *Cordyceps* sp.

De acuerdo a las características macroscópicas de los estados anamorfos en los hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* descritos por Samson (1974) y Humber (2012) y la técnica de recolección de Inglis et al., (2012), Sanjuan (2014), y Castillo et al., (2018); una pupa de *Danaus plexippus nigrippus* (Lepidoptera: Danainae) (Mariposa Monarca) (Fig. 1) recubierta con un hongo de micelio y sinemas rojizos con sus extremos blanquecinos y pulverulentos que indicaban conidiación se halló examinando de manera visual las hojas y tallos de las plantas, el suelo y los componentes abióticos dentro del mariposario. Dicho espécimen se recolectó por completo y se puso dentro de un vial de vidrio para su transporte y conservación. El hongo entomopatógeno se llevó hacia el laboratorio de Microbiología de la Planta Piloto de Alimentos

de la facultad de Agroindustria de la Universidad del Quindío donde se realizó su aislamiento, cultivo *in vitro*, caracterización e identificación.

7.3. Aislamiento de *Cordyceps* sp.

Siguiendo la técnica de Sanjuan, (2014), y Castillo et al., (2018); a partir de la pupa con micosis y en conidiación se realizó un “print” (toque rápido del ápice del sinema) sobre medio Sabouraud dextrosa agar (SDA) en una caja Petri de 90 mm de diámetro, y se incubó a 27 ± 2 °C con intervalos de luz-oscuridad 12-12 h por cinco días para obtener el aislamiento del hongo. Los aislamientos se obtuvieron extrayendo “plugs” (fragmentos circulares pequeños de medio sólido extraídos con pitillos plásticos) de 5 mm de diámetro conteniendo los puntos de crecimiento micelial (colonias pequeñas), sembrándolos en otras seis cajas Petri conteniendo medio PDA, SDA, y MA (Tabla 1), y llevándolos a incubar en las condiciones mencionadas por 60 días para producir la cantidad de micelio necesario en la extracción de plugs miceliales para los tratamientos. De los medios anteriores en que se hicieron los aislamientos se seleccionó la colonia desarrollada en SDA por presentar topografía plana y textura lisa.

7.4. Condiciones de Cultivo *In vitro* de *Cordyceps* sp.

Diecisiete medios de cultivo sólido se utilizaron para la caracterización micelial del hongo entomopatógeno, que se categorizaron de acuerdo a su composición química nutricional en pobre, propósito general, enriquecidos, y específicos, con base en la investigación desarrollada por Shrestha et al., (2006) (Tabla 1). La composición de los medios (Tabla 2) se adoptó de diferentes fuentes (Booth, 1971; Samson, 1974; Shrestha et al., 2006; Atlas, 2010; Castro-Pérez et al., 2013). El integumento para los medios suplementados con este se obtuvo de las exuvias de larvas y pupas que se criaron en el mariposario, se deshidrataron con un desecador y se maceraron finamente. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión por 20 min, y luego se sirvieron en cajas Petri de vidrio de 90 mm de diámetro de a 20 mL.

A cada caja Petri con medio de cultivo se le removió de su centro un plug de medio de 3.5 mm de diámetro y se remplazó con un plug de medio con micelio extraído del borde de la colonia de *Cordyceps* sp. A partir del plug micelial se dibujó al reverso de las cajas Petri dos ejes ortogonales como referencia para el registro de la medida de la colonia usando los dos diámetros cardinales X e Y.

Tabla 1: Categorías de los diferentes medios de cultivo usados en el presente estudio.

Categoría	Nombre completo del medio seguido de su abreviación
Medios pobre	Agua – Agar (WA)
	Peptona – Agar (PA)
Medios de propósito general	Malta – Agar (MA)
	Malta – Dextrosa – Peptona – Agar (MEA)
	Levadura – Malta – Dextrosa – Peptona – Agar (YMA)
	Czapek-Dox – Agar (CDA)
	Extracto de papa – Dextrosa – Agar (PDA)
Medios enriquecidos	Sabouraud – Dextrosa – Agar (SDA)
	Sabouraud – Dextrosa – Levadura – Agar (SDYA)
	Sabouraud – Dextrosa – Malta – Agar (SDMA)
	Levadura – Peptona – Glucosa – Agar (YPGA)
	Czapek-Dox – Levadura – Agar (CDYA)
	Agua – Agar + Integumento (WA+I) Pobre
	Sabouraud – Dextrosa – Malta – Agar + Integumento (SDMA+I)
Medios específicos	Levadura – Malta – Dextrosa – Peptona – Agar + Integumento (YMA+I)
	Czapek-Dox – Agar + Integumento (CDA+I)
	Czapek-Dox – Levadura – Agar + Integumento (CDYA+I)

Las muestras se incubaron ordenadas en una sola capa (no apiladas) bajo condiciones de continua iluminación y otras en oscuridad considerando las metodologías desarrolladas por Leach (1971); Rangel et al., (2011), y Oliveira et al., (2018).

La iluminación se suministró con un circuito de fragmentos de tres diodos emisores de luz visible (LEDs) 3M[®] SMD 5050 blanca fría distribuidos proporcionalmente (Fig. 1A) y suspendidos a 120 mm de las muestras (Fig. 1B) con un espectro electromagnético de 380-800 nm (Fig. 2) y una intensidad luminosa media de 400 lx (5.76 cd). La medida de la intensidad luminosa y de su uniformidad dentro de la incubadora se realizó con la distancia donde se ubicaron las colonias del circuito LEDs y a través de las tapas de las cajas Petri por medio de un fotómetro digital Extech HD450[®] (Extech Instruments Corporation; USA). La medida del espectro electromagnético se realizó por medio de un espectrómetro Horiba FHR 1000[®] equipado con una rejilla de difracción de 1800 g/mm que admite un rango de 450-800 nm y con una cámara detectora CCD Horiba Sincerity[®], la recolección y el procesamiento de las lecturas se realizaron por medio del software Horiba NGS LabSpec 5[®] (Horiba Scientific; Horiba Ltd.; Japón).

Tabla 2: Composición y concentración (g/L) del medio de cultivo usado en el presente estudio.

Componentes	Medios *																
	WA	PA	MA	MEA	YMA	CDA	PDA	SDA	SDYA	SDMA	YPGA	CDYA	WA+I	SDMA+I	YMA+I	CDA+I	CDYA+I
Dextrosa				20	10		20	40	40	40	20			40	10		
Sucrosa						30						30				30	30
Peptona		20		1	5			10	10	10	10			10	5		
Extracto papa							200										
Extracto malta			20	20	3					10				10	3		
Extracto levadura					3				10		10	5			3		5
Avena																	
KCl						0,5						0,5				0,5	0,5
NaNO ₃						3						3				3	3
K ₂ HPO ₄						1						1				1	1
FeSO ₄ 7H ₂ O						0,01						0,01				0,01	0,01
MgSO ₄ 7H ₂ O						0,5						0,5				0,5	0,5
Integumento													10	10	10	10	10
pH			6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0		6,0	6,0	6,0	6,0
Agar	20	20	20	20	20	20	20	15	15	15	15	20	20	15	20	20	20

* Referirse a la Tabla 1 para las abreviaciones del medio.

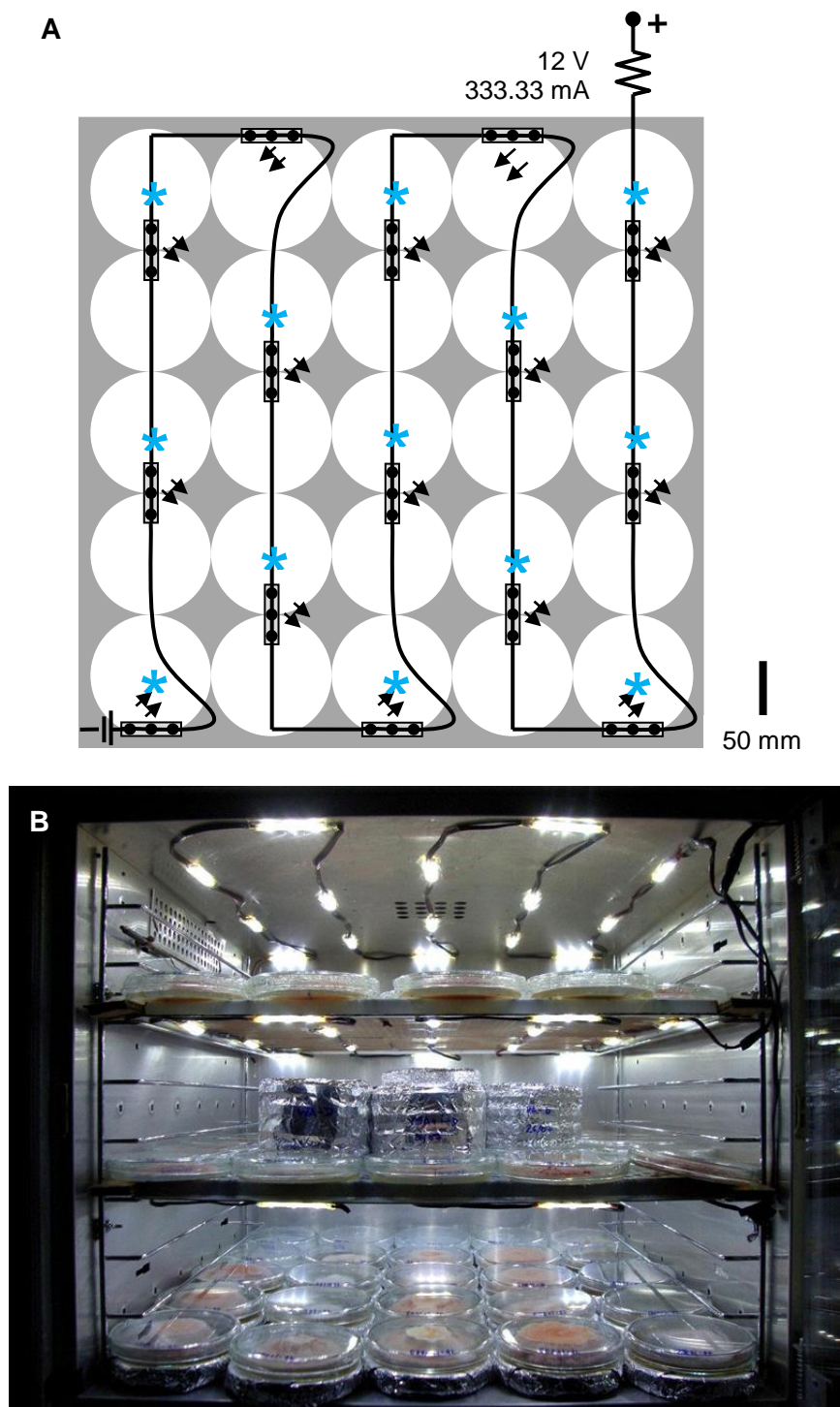






Fig. 1: Montaje experimental para estudiar los efectos de la luz y oscuridad en el crecimiento y la producción de pigmentos de *Cordyceps* sp. aislamiento AO026. **A.** Distribución de las cajas Petri y los fragmentos LEDs en cada nivel de la incubadora (Caja Petri y espacio alrededor , fragmento de LEDs , luz emitida , puente eléctrico , punto de registro de la intensidad luminosa *). **B.** Iluminación de las colonias en cultivo.

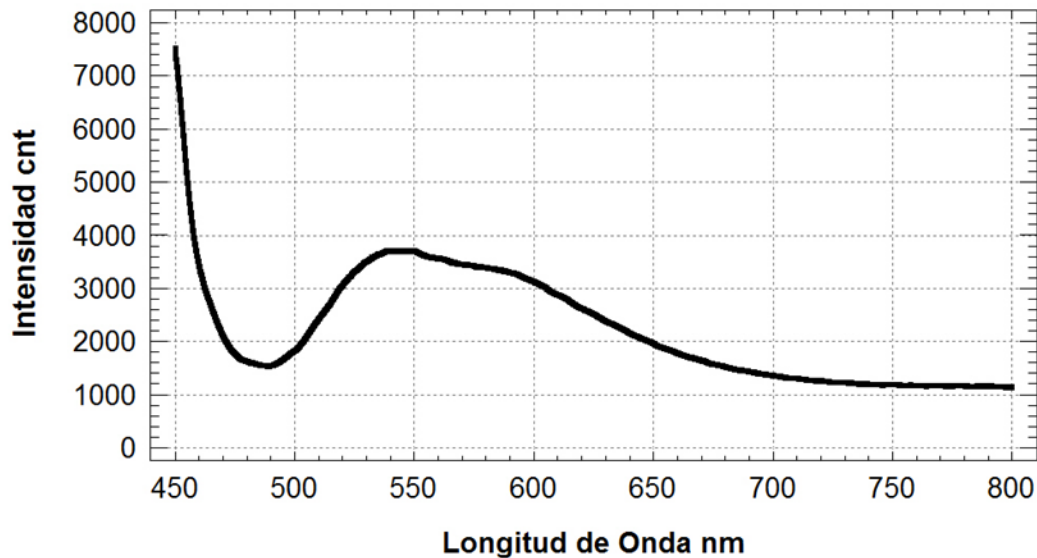


Fig. 2: Lectura del espectrofotómetro sobre el circuito de LEDs (3M® SMD 5050 blanca fría) usado como la fuente de luz visible en el montaje experimental para estudiar sus efectos en el desarrollo de las características morfológicas de las colonias de *Cordyceps* sp.

Las muestras bajo continua oscuridad fueron cubiertas con láminas finas de aluminio y para su observación se descubrían individualmente cada semana por un tiempo no mayor de 60 s para evitar cualquier estímulo fisiológico ocasionado por la luz (Sánchez-Murillo et al., 2004; Corrochano y Galland, 2006; Tisch y Schmoll, 2010).

Las cuatro réplicas por medio de cultivo y condición se incubaron a 27 ± 2 °C durante ocho semanas con rotación de su ubicación dentro de la incubadora por cada tres días.

7.5. Caracterización Morfológica de *Cordyceps* sp.

La caracterización del estado conidiogénico de *Cordyceps* sp. consistió en la descripción de sus estructuras morfológicas y de su crecimiento micelial *in vitro* deduciendo un valor taxonómico para la identificación de especie de acuerdo a Samson (1974) y Humber (2012). Las formas más relevantes fueron registradas con fotografía por una cámara digital.

La caracterización morfológica se realizó por descripción del espécimen recolectado y por medio de la preparación de microcultivos y el montaje de placas con las muestras teñidas con azul de lactofenol para la observación con el microscopio óptico compuesto con contraste de fase y aumento de 40–100 x utilizando la técnica descrita por Humber (2012), Inglis et al., (2012), y Humber et al., (2013).

Los microcultivos fueron desarrollados con plugs de 7 mm de diámetro de medio SDYA colocados sobre portaobjetos y estos situados dentro de cajas Petri con papel filtro en el fondo humedecido con 3 mL de agua destilada estéril. Los plugs de SDYA fueron inoculados con tejido del hongo obtenido de la colonia del aislamiento, y encima fueron colocados los cubreobjetos. Las tapas de las cajas Petri fueron puestas y selladas, y los microcultivos fueron incubados a 27 ± 2 °C bajo intervalos de luz y oscuridad 12:12 h hasta que la conidiación fue evidente.

Los cubreobjetos y portaobjetos usados en el microcultivo fueron montados para la microscopía después de la remoción de los bloques de SDYA. Las descripciones se hicieron por medio de las fotografías obtenidas con un microscopio Axiostar plus® (Carl Zeiss; Francia) equipado con una cámara digital Canon Eos Rebel T3i® (Canon Inc.; Japón). Los diferentes planos enfocados con la profundidad de campo de las estructuras observadas fueron fotografiadas y combinadas en una sola imagen (apilamiento de enfoque) y posteriormente se realizaron las medidas, ambas actividades a través del software Image-Pro Plus 7.0® (Media Cybernetics Inc.; Holanda). Un total de 100 medidas independientes de hifas, fiálides, cuellos de fiálides y conidios fueron realizadas determinando el largo y ancho, y la forma y disposición en que se encontraban.

La caracterización del crecimiento micelial se llevó a cabo por observación de las colonias cada siete días registrando las siguientes características: color del anverso y reverso comparado con el sistema de colores Munsell (1929), densidad micelial dependiendo del micelio aéreo (- extremadamente pobre, + pobre, ++ moderado, o +++ abundante), textura micelial (F lisa, SC semialgodonosa, o C algodonosa), y diámetro de las colonias en mm (medidas en eje X e Y) (Shrestha et al., 2006).

7.6. Análisis Estadístico

Para caracterizar la morfología en el crecimiento de *Cordyceps* sp. se empleó por diseño experimental los bloques completos aleatorizados constituidos cada uno con cuatro colonias del hongo como unidades experimentales. Se evaluó los efectos de dos factores o tratamientos que fueron el medio de cultivo y la condición de luz y oscuridad constantes durante ocho semanas de cultivo. Las variables respuestas fueron pigmentación, densidad micelial y textura micelial de carácter nominal, y crecimiento diametral de carácter numérico de las que se registraron datos semanalmente.

En una hoja de cálculo Excel® (Microsoft Corporation; USA) se estructuraron los datos generados por la investigación y la que posteriormente se utilizó para realizar las evaluaciones comportamentales de las variables respuestas a nivel de muestra y por semana con métodos estadísticos descriptivos. Los datos de las densidades y texturas miceliales semanales se sometieron a la moda como medida de tendencia central, y los diámetros semanales a la media aritmética obteniéndose de las medidas en los ejes ortogonales por unidad experimental y luego del bloque completo. La tasa de crecimiento radial (K_r) (velocidad en mm/semana) fue usado para evaluar la influencia de los medios de cultivo sobre el hongo en las condiciones de incubación de luz y oscuridad calculado a través del análisis de regresión lineal ya que dicho crecimiento se ajustó a un modelo lineal ($y=a+bx$) seguido de su coeficiente de determinación (r^2) para valorar la bondad de ajuste del modelo (Fargues et al., 1992; Cabanillas y Jones, 2009; Inglis et al., 2012).

Para determinar los efectos de los medios de cultivo y de la condición de luz y oscuridad durante el crecimiento micelial por métodos estadísticos inferenciales se realizaron pruebas de independencia Chi-Cuadrado (X^2) en la pigmentación, densidad y textura micelial con los medios de cultivo y la condición de incubación. Para el crecimiento diametral se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple en cada factor y luego un análisis de varianza factorial con los dos factores y con interacción. En este análisis se utilizó el software estadístico Statgraphics Centurion XV 15.1.03® (Stat Point Technology, Inc.; USA) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1. Morfología de *Cordyceps* sp.

Cordyceps sp. se caracterizó por presentar 37 sinemas cilíndricos gregarios de $5,6 \pm 2,1$ (2,8–10,1) mm de longitud y $0,3 \pm 0,1$ (0,2–0,6) mm de diámetro (promedio \pm desviación estándar (tamaño mínimo–tamaño máximo)), simples, dicotómicos o ramificados irregularmente, con bases estériles de micelio anaranjado a rojizo (7,5YR7/12–7,5R6/12) (códigos del sistema de colores Munsell, 1929) intensificándose el color distalmente y con la edad, sus ápices ramificados, blancos con aspecto pulverulento por la acumulación de conidios de $1,6 \pm 0,7$ (2,8–10,1) mm de longitud y $0,3 \pm 0,1$ (0,4–1,2) mm de diámetro, hospedando sobre una pupa de

Danaus plexippus nigrippus (Lepidoptera) cubriéndola totalmente y ubicándose en el suelo con musgo bajo sombra dentro del mariposario (Fig. 3A).

Hifa vegetativa lisa, cilíndrica, septada e hialina de $1,1 \pm 0,3$ (0,6–2,0) μm de diámetro.

Conidióforos monohifales, erectos, hialinos, simples o ramificados, soportando directamente fiálides solitarias, apareadas formada como una pinza, o gregarias en verticilos a veces densos con intervalos sobre un funículo (Fig. 3B–C). Fiálides (células conidiogénicas) cilíndricas y alargadas de $4,7 \pm 1,2$ (2,6–8,6) μm de longitud y $1,7 \pm 0,3$ (1,1–2,7) μm de diámetro, lisas, hialinas, en forma de botella con las bases ligeramente hinchadas o subglobosas, a veces globosas, que inmediatamente se estrechaban en un notable cuello en el ápice (Fig. 3B–E) (Tabla 3). Conidios unicelulares de $2,0 \pm 0,4$ (1,3–3,1) μm de longitud y $1,2 \pm 0,2$ (0,7–1,7) μm de diámetro, con superficies lisas, hialinas, piriformes a clavadas o reniformes, ocasionalmente ovoides, emergiendo a partir del ápice de las fiálides en una sola cadena curvada, a veces dos unidas oblicuamente formando una amplia “V” (Fig. 3D–F) (Tabla 3).

Todas las características morfológicas descritas fueron típicas a los hongos entomopatógenos isariformes de *Cordyceps* s. s. de acuerdo con Samson (1974), Luangsa-ard *et al.*, (2005), y Humber (2012). La morfología microscópica de este aislamiento fue bastante parecida a los estados conidiogénicos de *Blackwellomyces cardinalis*, *Evlachovaea kintrischica*, *Cordyceps fumosorosea*, *C. amoenerosea*, *C. niphetodes*, *C. cateniobliqua*, y *C. cateniannulata*.

8.2. Pigmentación de *Cordyceps* sp.

Varios grados de pigmentación de las colonias fueron producidas durante el cultivo de *Cordyceps* sp. en la mayoría de los medios bajo las condiciones de luz y oscuridad constantes. Sin embargo, la luz generó mayor intensidad del color de todas las colonias entre tonos anaranjados a rojos intensos iguales o muy cercanos a la pigmentación del hongo *in situ* recolectado en el mariposario (Fig. 3 y Fig. 4); excepto en WA+I, y en los medios MA, MEA, CDA, PDA, y SDMA cultivados bajo oscuridad que produjeron tonos rosados (7,5R8/4–5YR8/4), y los demás bajo la misma condición sin pigmentación alguna (Blanco) (Fig. 6).

Bajo incubación con luz, las colonias que produjeron pigmentación anaranjada (2,5YR7/10) fueron WA, CDA, SDA, CDYA y SDMA+I; pigmentación anaranjada a rojo (10R6/10–10R6/14) MA, MEA, PDA, SDYA, YMA+I, CDA+I y CDYA+I; y pigmentación rojo intenso (7,5R6/14–7,5R5/18) PA, YMA, SDMA y YPGA.

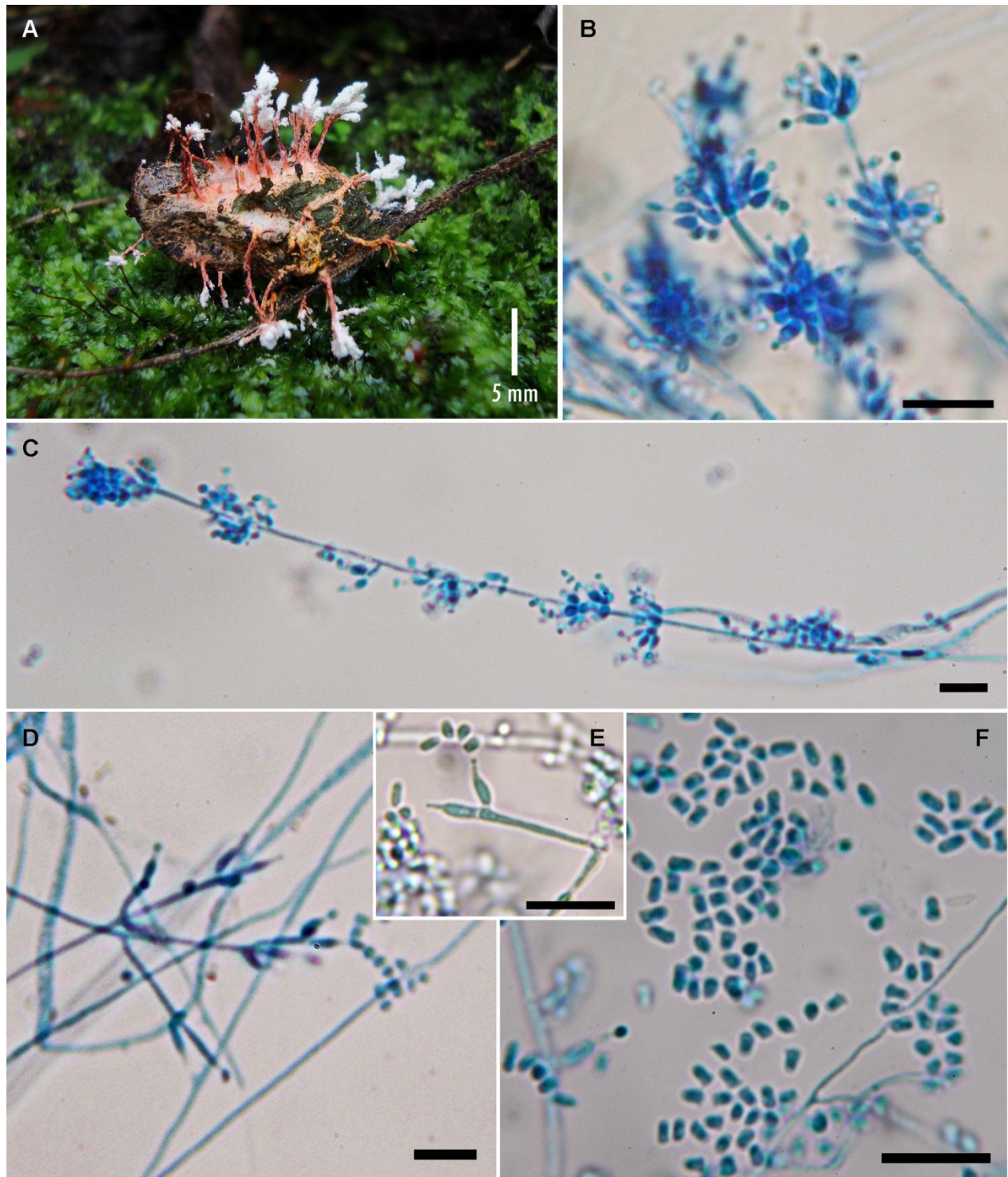


Fig. 3: Características morfológicas del espécimen de *Cordyceps* sp. **A.** Sobre pupa de *Danaus plexippus nigrippus* (Lepidoptera) exhibiendo micelio y sinemas rojizos con sus ápices en conidiación. **B.** Conidióforos simples conformado inmediatamente por células conidiogénicas (fiálides). **C.** Hifa soportando a intervalos varios conidióforos simples. **D – E.** Conidióforos ramificados soportando una cadena de conidios. **F.** Conidios. Escala de las barras = 10 µm.

Tabla 3: Características morfológicas de *Cordyceps* sp. recolectado en el mariposario Amaranta de Colombia y cultivado *in vitro*.

Estructura	Longitud		Diámetro		L/D	
Sinemas	5,6 ± 2,1	(2,8 - 10,1)*	0,3 ± 0,1	(0,2 - 0,6)	17,0 ± 7,1	(7,5 - 33,5)
Ápices de sinemas	1,6 ± 0,7	(0,8 - 3,1)	0,7 ± 0,3	(0,4 - 1,2)	2,2 ± 0,4	(1,5 - 3,0)
Hifas	----	----	1,1 ± 0,3	(0,6 - 2,0)**	----	----
Fiálides	4,7 ± 1,2	(2,6 - 8,6)	1,7 ± 0,3	(1,1 - 2,7)	2,9 ± 1,1	(1,4 - 7,4)
Cuello de fiálides	1,3 ± 0,4	(0,5 - 2,4)	0,6 ± 0,2	(0,3 - 1,0)	2,4 ± 1,1	(1,0 - 6,3)
Conidios	2,0 ± 0,4	(1,3 - 3,1)	1,2 ± 0,2	(0,7 - 1,7)	1,7 ± 0,4	(1,0 - 3,3)

* Medida promedio (mm ± SD) seguido por el tamaño mínimo y máximo de las estructuras macroscópicas de *Cordyceps* sp. *n* = 20. Las muestras se obtuvieron del insecto hospedero del espécimen recolectado.

** Medida promedio (µm ± SD) seguido por el tamaño mínimo y máximo de las estructuras microscópicas de *Cordyceps* sp. *n* = 100. Las muestras se obtuvieron del aislamiento y por microcultivo.

El periodo de incubación fue otro factor importante para el desarrollo de la pigmentación del hongo. En la mayoría de los medios, la pigmentación fue progresivamente más intensa transcurridas las semanas; no obstante, tendía a decolorarse en algunos medios por el crecimiento de micelio nuevo sin coloración, especialmente en el centro y margen de la colonia, y por la producción y acumulación de conidios incoloros.

Proporcional a la pigmentación presentada en el anverso de todas las colonias también lo fue en su reverso. El reverso de las colonias crecidas en presencia de la luz fue más intenso que aquellas crecidas en oscuridad. Sin embargo, la pigmentación del micelio fue un poco diferente y no fue tan uniforme como en su anverso, especialmente fue más intensa en su centro y se desvanecía en el resto de la colonia conforme a la formación de círculos concéntricos de pigmentación. A su vez, estas coloraciones fueron afectadas para su observación por la densidad compacta del micelio y por el color y grosor del medio de cultivo, especialmente en aquellos medios compuestos con integumento que no se pudieron ver (WA+I, SDMA+I, YMA+I, CDA+I, CDYA+I).

La pigmentación del reverso de las colonias crecidas en presencia de la luz fueron de tonos marrón (10R4/12–10R3/10) en CDA y SDA; rojo (7,5R5/16) en PA; anaranjado intenso (5YR7/12–10YR8/6) en MA, MEA, YMA, PDA, SDMA, y YPGA; y amarillo intenso (2,5Y8/8–5Y9/4–7,5Y9/8) en SDA, SDYA, y CDYA (Fig. 5).

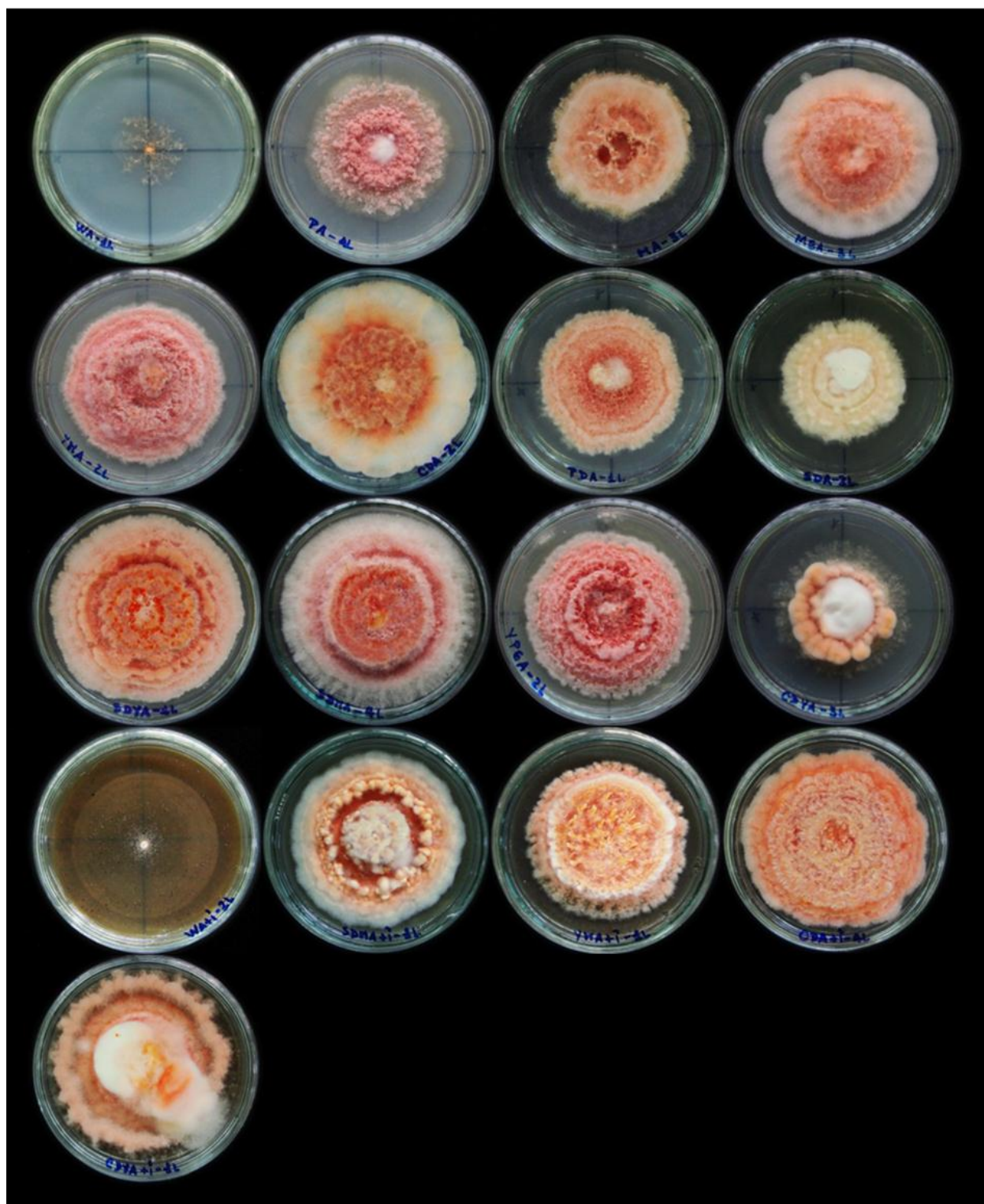


Fig. 4: Anverso de las colonias de *Cordyceps* sp. después de ocho semanas de incubación con iluminación constante en diferentes medios sólidos. Medios (De izquierda a derecha y en orden descendente): WA, PA, MA, MEA, YMA, CDA, PDA, SDA, SDYA, SDMA, YPGA, CDYA, WA+I, SDMA+I, YMA+I, CDA+I, y CDYA+I).

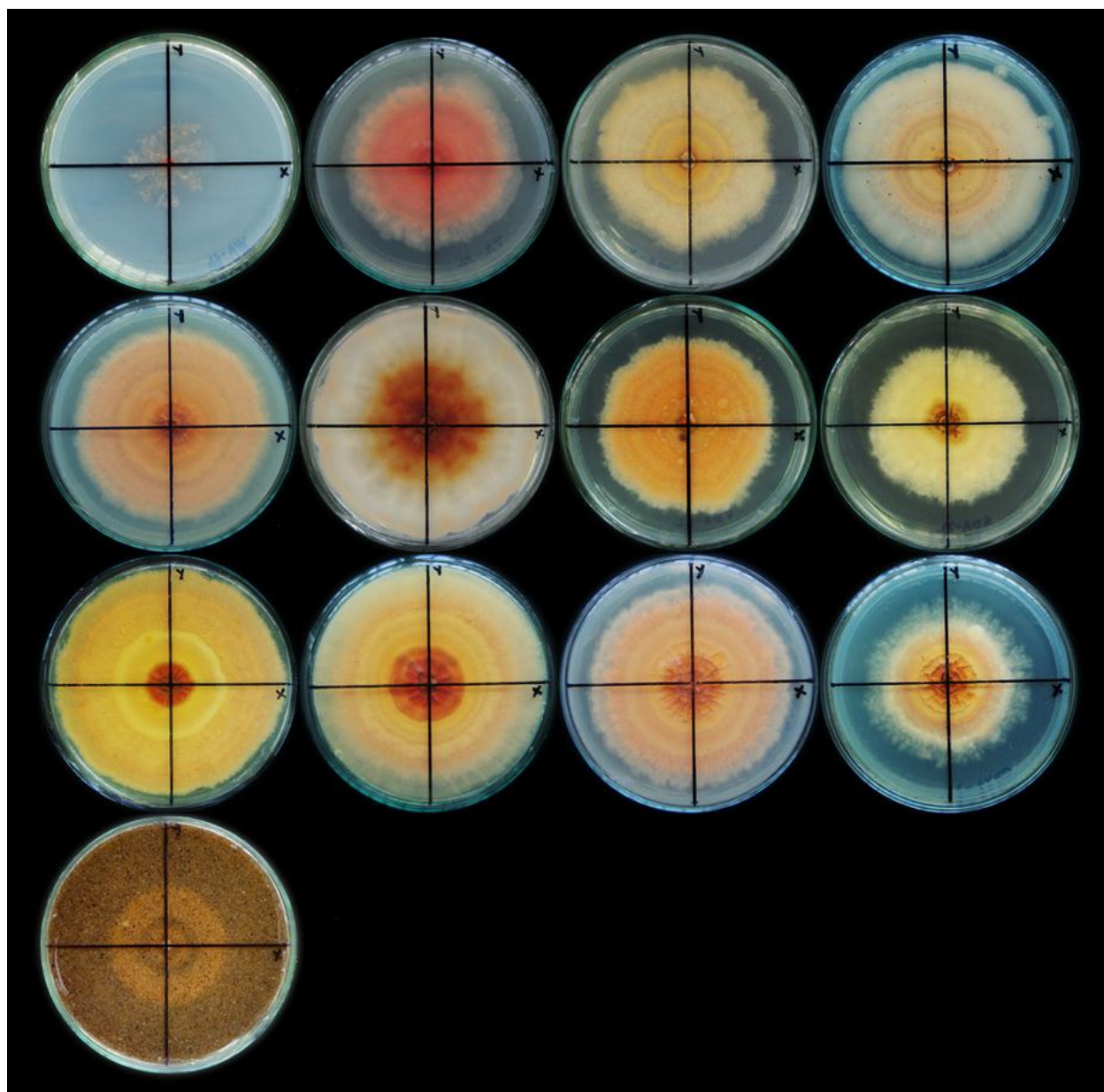


Fig. 5: Reverso de las colonias de *Cordyceps* sp. después de ocho semanas de incubación con iluminación constante en diferentes medios sólidos. Medios (De izquierda a derecha y en orden descendente): WA, PA, MA, MEA, YMA, CDA, PDA, SDA, SDYA, SDMA, YPGA, CDYA, y WA+I). Los medios suplementados con integumento como WA+I no permitieron la observación de las características de las colonias en su reverso por su composición compacta no translúcida.



Fig. 6: Anverso de las colonias de *Cordyceps* sp. después de ocho semanas de incubación con oscuridad constante en diferentes medios sólidos. Medios (De izquierda a derecha y en orden descendente): WA, PA, MA, MEA, YMA, CDA, PDA, SDA, SDYA, SDMA, YPGA, CDYA, WA+I, SDMA+I, YMA+I, CDA+I, y CDYA+I).

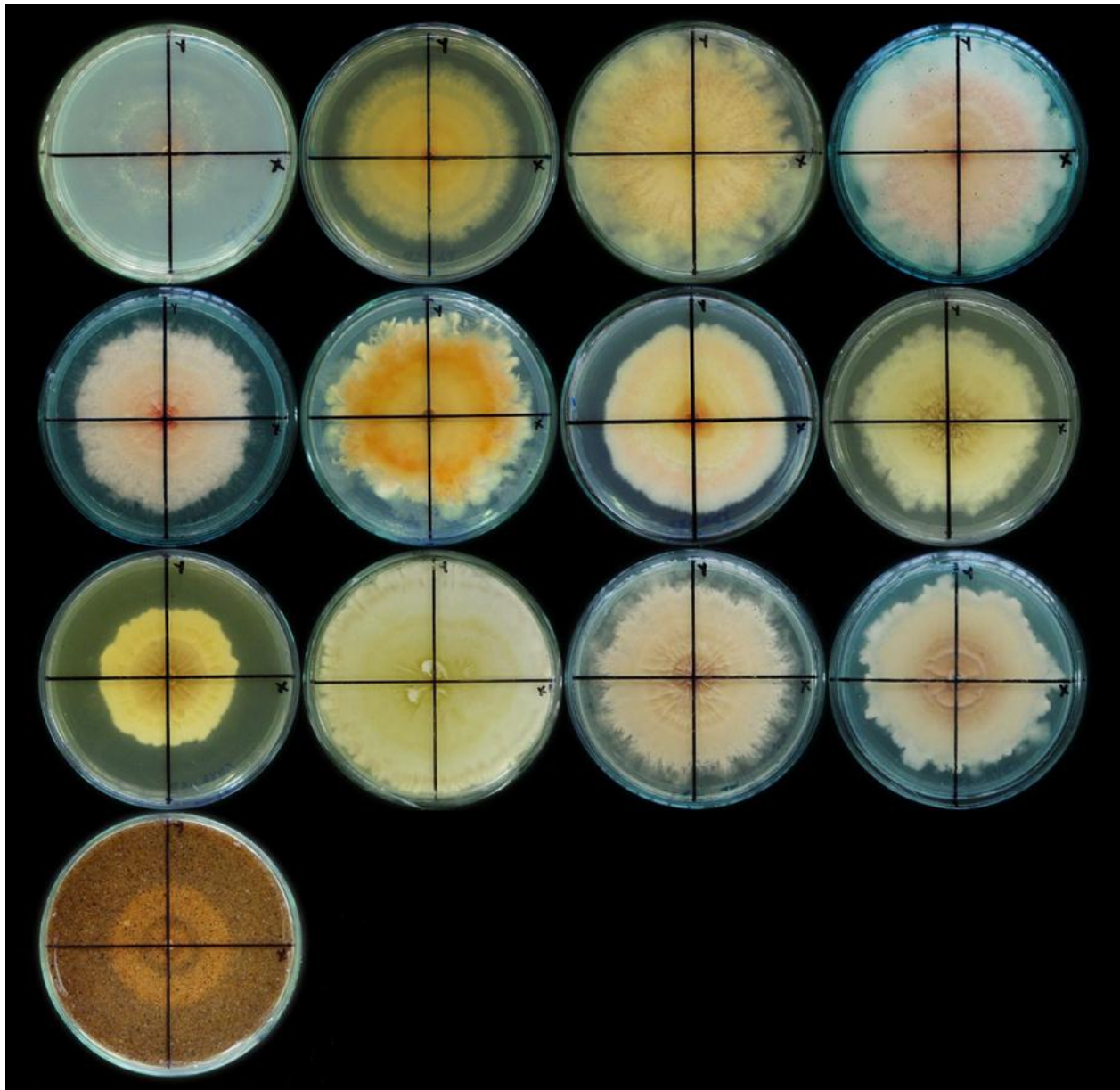


Fig. 7: Reverso de las colonias de *Cordyceps* sp. después de ocho semanas de incubación con oscuridad constante en diferentes medios sólidos. Medios (De izquierda a derecha y en orden descendente): WA, PA, MA, MEA, YMA, CDA, PDA, SDA, SDYA, SDMA, YPGA, CDYA, y WA+I). Los medios suplementados con integumento como WA+I no permitieron la observación de las características de las colonias en su reverso por su composición compacta no translúcida.

Las colonias crecidas en oscuridad presentaron menos círculos concéntricos de pigmentación y por lo tanto fueron más uniforme en su coloración. Anaranjado (5Y8/10–7,5YR7/12) en CDA; amarillo (2,5Y8/8–5Y9/4–7,5Y9/4) en PA y MA; rosado (2,5YR7/6–5YR8/4–10YR8/6) en WA, MEA, YMA, y PDA; y amarillo pálido (2,5Y8/4–7,5Y9/8–10Y9/4) fue en SDA, SDYA, SDMA, YPGA, y CDYA (Fig. 7).

8.3. Densidad y Textura Micelial de *Cordyceps* sp.

En este estudio, el peso cuantitativo del micelio cultivado no se midió, de ahí que las características de densidad y textura micelial de *Cordyceps* sp. fueron definidas en categorías descriptivas comparativas. Las características fueron registradas por periodos de incubación resumiéndose en la moda de la categoría por semana para cada medio en las condiciones de luz y oscuridad constantes, luego fueron analizadas por su frecuencia y pruebas de independencia Chi-Cuadrado (X^2) al finalizar los tratamientos.

La densidad de micelio del hongo incubado bajo luz varió progresivamente de una categoría a otra en cada semana transcurrida, a excepción en WA y WA+I que siempre fue extremadamente pobre, en PA pobre a moderado, y en SDA moderado (Tabla 4). La densidad micelial varió de moderado a abundante en casi todos los medios, YMA, SDYA, SDMA, YPGA, CDYA, CDA+I, y CDYA+I, principalmente en la quinta semana; y pasando por todas las categorías en MA, MEA, CDA, PDA, y YMA+I. El medio SDMA+I fue el único en que la densidad micelial presentó un incremento y luego una disminución siendo abundante en casi todo el tratamiento y al finalizar moderado.

Bajo la incubación en oscuridad, la densidad de micelio del hongo siempre fue extremadamente pobre en WA; moderada en PA, SDA, SDYA, YPGA, y YMA+I, y abundante en MA en cada semana del tratamiento; mientras que de moderada a abundante en MEA, YMA, SDMA, y SDMA+I; pasando por todas las categorías en CDA, PDA, y CDYA; y en el resto de los medios no fue progresivo el cambio de una categoría a la otra, sino que hubo una disminución de moderado a pobre en WA+I, y una disminución de moderado a pobre y luego un incremento hasta abundante en CDA+I y hasta moderado en CDYA+I (Tabla 5).

La luz influyó en la producción de micelio aéreo comparado con la oscuridad. La mayoría de las colonias cultivadas en los medios en condición de luz llegaron más tempranamente a densidades abundantes comparados con los de oscuridad, a excepción de MA y MEA. Colonias en medios como SDA, SDYA, YPGA, YMA+I, y CDYA+I pasaron de moderadas a abundantes en la condición de luz, mientras que en oscuridad sólo presentaron densidades moderadas.

Tabla 4: Densidad micelial de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos de cultivo y periodos de incubación con iluminación constante.

Medio	Semana							
	1	2	3	4	5	6	7	8
WA	-	-	-	-	-	-	-	-
PA	++	+/++	+/++	+/++	++	+/++	+/++	+/++
MA	+	+/++	++	++	++/+++	+++	+++	+++
MEA	+	++	++	++	++	+++	+++	+++
YMA	++	+/++	++	++	++	++/+++	+++	+++
CDA	-/+	+	+	++	++	++/+++	+++	+++
PDA	+	+	+	++	++	+++	+++	+++
SDA	++	++	++	++	++	++	++	++/+++
SDYA	++	++	++	++	++/+++	+++	+++	+++
SDMA	++	++	++	++	++	++/+++	++/+++	++/+++
YPGA	++/+++	++	++	++	++	+++	+++	+++
CDYA	++	++	++	++	++/+++	+++	++/+++	++/+++
WA+I	-	-/+	-/+	-/+	-	-	-	-
SDMA+I	++	+++	+++	+++	++/+++	++/+++	++	++
YMA+I	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CDA+I	++	++	++	++/+++	+++	+++	+++	+++
CDYA+I	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- Extremadamente pobre, + Pobre, ++ Moderado, +++ Abundante.

Se evidenció dependencia entre la densidad micelial y el medio de cultivo (X^2 , $P = 0,0001$). Así, la frecuencia de cada categoría de densidad micelial de acuerdo con el medio muestra que los medios WA y WA+I presentaron una densidad extremadamente pobre (-) a pobre (+) con un poco incremento sobre el segundo medio; moderada (++) y abundante (+++) fue presente en casi todos los medios siendo más constantemente moderada en PA, SDA, SDYA, SDMA, YPGA y YMA con la frecuencia más alta en SDA, y abundante en MEA, MA, CDA+I, CDYA+I, y PDA con la frecuencia más alta en MEA (Fig. 8).

La frecuencia de las categorías de densidad micelial de acuerdo con la condición de incubación luz u oscuridad constantes señala que ambas condiciones produjeron cantidades similares de micelio al finalizar los tratamientos (Fig. 9). Sin embargo, se demostró dependencia entre la densidad micelial y la condición de cultivo (X^2 , $P = 0,0001$). En general, las categorías moderada (++) y abundante (+++) fueron las más frecuentes en las dos condiciones de cultivo con diferencias significativas de las demás densidades. A pesar de esto, la densidad moderada

fue más constante que abundante en oscuridad mientras que con luz ambas fueron parecidas. Las categorías de densidades menores, extremadamente pobre (-) y pobre (+), fueron las menos frecuentes pero tienden a aumentar a moderado sólo en oscuridad.

Tabla 5: Densidad micelial de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos y periodos de incubación con oscuridad constante.

Medio	Semana							
	1	2	3	4	5	6	7	8
WA	-	-/+	-	-	-	-	-	-
PA	++	++	++	++	++	++	++	++
MA	+++	++/+++	++/+++	++/+++	+++	+++	+++	+++
MEA	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
YMA	++	++	++	++	++	+++	++/+++	++/+++
CDA	+	+	++	++	++/+++	+++	+++	+++
PDA	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++
SDA	++	++	++	++	++	++	++	++
SDYA	++/+++	++	++	++	++	++	++	++
SDMA	++	++	++	++	++	++/+++	+++	+++
YPGA	++	++	++	++	++	++	++	++
CDYA	+	+	+	+	++	++	++	++/+++
WA+I	++	+/++	+/++	+	+	+	+	+
SDMA+I	++	++	++	++	++	++	+++	+++
YMA+I	++/+++	++	++	++	++	++	++	++
CDA+I	++	+	+	++	+/++	+++	+++	+++
CDYA+I	++	++	+	+	+/++	++	++	++

- Extremadamente pobre, + Pobre, ++ Moderado, +++ Abundante.

La textura de las colonias cultivadas en continua iluminación fueron constantemente lisas en los medios WA y WA+I, y semialgodonosas en SDA y YPGA; de textura semialgodonosa a algodonosa en MA, MEA, SDYA, SDMA, CDYA, YMA+I, y CDA+I; y con los tres tipos de textura desde lisa a algodonosa en CDA y PDA; en PA, YMA, SDMA+I, y CDYA+I tuvieron semanas con cambio de tipo de textura a las cuales retornaban semanas posteriores (Tabla 6).

En oscuridad constante, los medio WA y WA+I presentaron una textura lisa invariable, en PA, SDA, SDYA y YPGA siempre fue semialgodonosa, y en MA y MEA algodonosa; de textura lisa a semialgodonosa en CDYA+I; de semialgodonosa a algodonosa en YMA, PDA, SDMA, SDMA+I, y YMA+I; y presentando todas los tipos de textura en CDA, CDYA, y CDA+I (Tabla 7).

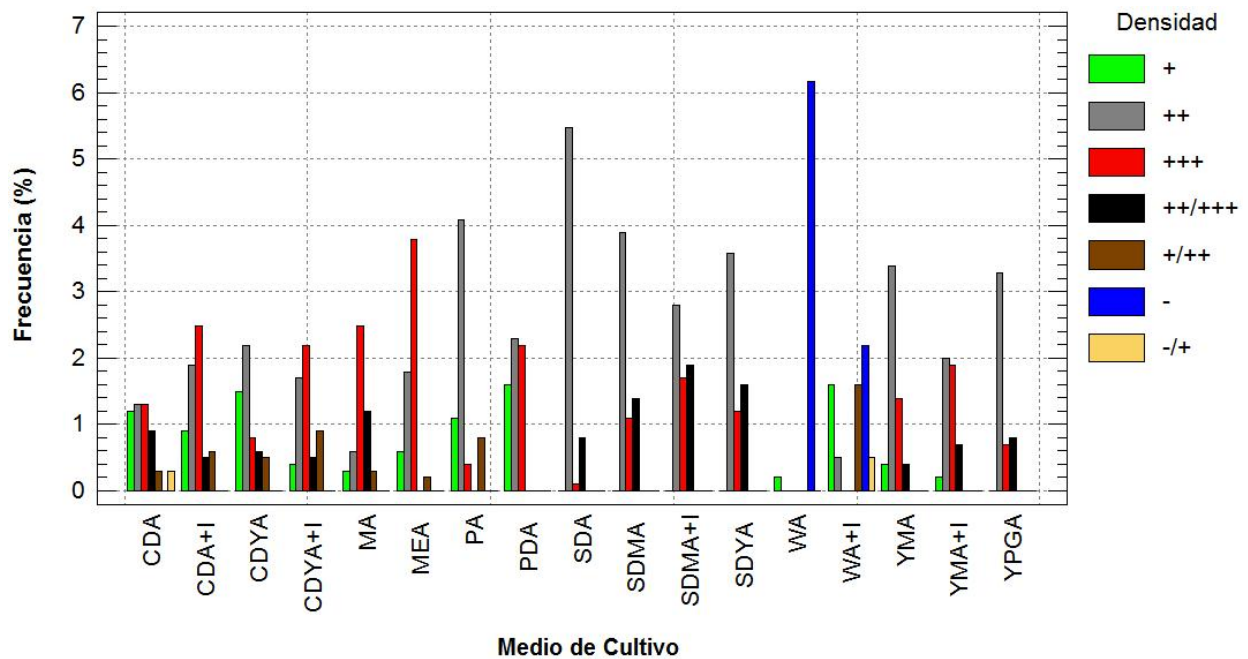


Fig. 8: Densidad micelial de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos de cultivo después de ocho semanas de incubación con iluminación y oscuridad constantes. El gráfico muestra la frecuencia en porcentaje de cada categoría de densidad micelial de acuerdo con el medio de cultivo. Densidad: - Extremadamente pobre, + Pobre, ++ Moderado, +++ Abundante. (χ^2 ; $P \leq 0.01$).

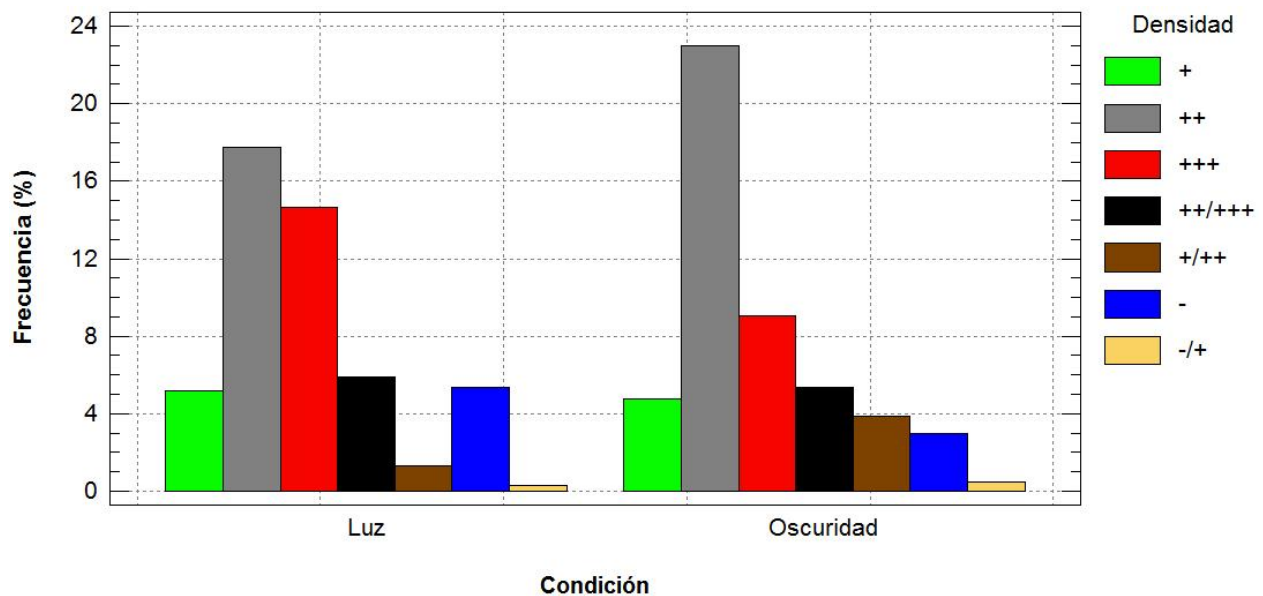


Fig. 9: Densidad micelial de *Cordyceps* sp. después de ocho semanas de incubación con iluminación y oscuridad constantes. El gráfico muestra la frecuencia en porcentaje de cada categoría de densidad micelial de acuerdo con la condición de cultivo. Densidad: - Extremadamente pobre, + Pobre, ++ Moderado, +++ Abundante. (χ^2 ; $P \leq 0.01$).

Tabla 6: Textura micelial de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos y periodos de incubación con iluminación constante.

Medio	Semana							
	1	2	3	4	5	6	7	8
WA	F	F	F	F	F	F	F	F
PA	C	SC	F	F	F/SC	F/SC	F/SC	F/SC
MA	F/SC	F/SC	F/SC	SC	C	C	C	C
MEA	SC	SC	SC	SC	C	C	C	C
YMA	C	SC	F/SC	SC	SC	C	C	C
CDA	F	F	F	SC	SC	SC/C	C	C
PDA	SC	F	F	SC	SC	C	C	C
SDA	SC	SC	SC	F/SC	SC	SC	SC	SC/C
SDYA	SC	SC	SC	SC	SC	C	C	C
SDMA	SC	SC	SC	SC	SC	SC/C	C	C
YPGA	C	SC	F/SC	SC	SC	SC/C	SC/C	SC/C
CDYA	SC	SC	F/SC	SC	C	C	C	C
WA+I	F	F	F	F	F	F	F	F
SDMA+I	SC/C	C	C	SC/C	SC	SC	SC	SC
YMA+I	F/SC	SC/C	C	C	C	C	C	C
CDA+I	SC	F/SC	F/SC	SC	C	C	C	C
CDYA+I	SC	SC	SC/C	SC/C	C	C	SC/C	SC/C

F Lisa, SC Semialgodonosa, C Algodonosa.

La textura micelial de *Cordyceps* sp. también fue diferencialmente influenciada por el medio de cultivo (X^2 , $P = 0,0001$) (Fig. 10). La textura lisa (F) fue predominante en el medio WA; con la misma categoría le siguió WA+I con diferencia significativa. Aunque PA, PDA, CDA, CDYA, YMA+I, CDA+I, y CDYA+I, presentaron la textura lisa en algún momento durante el cultivo, principalmente entre la primera y quinta semana, desarrolló luego los otros tipos de texturas. La textura lisa a semialgodonosa (F/SC) se presentó con una frecuencia intermedia en todos los medios, excepto en WA; igualmente sucedió con la textura semialgodonosa a algodonosa (SC/C). SDA, SDYA, SDMA, y SDMA+I produjeron micelio semialgodonoso (SC) con más frecuencia que el resto de los medios. Los medios de cultivo MA, MEA, CDA, YMA, y CDA+I fueron los más algodonosos (C) en especial MA, seguidos estos por PA, PDA, SDMA, CDYA, SDMA+I, y YMA+I.

El test Chi-Cuadrado (X^2) determinó que la condición de cultivo no tiene relación con la textura micelial, dado que el P -Valor fue de 0,4684 (Fig. 11). Es decir, las colonias de

Cordyceps sp. produjeron las mismas cantidades categóricas de textura micelial si se compara por las condiciones de luz con oscuridad. No obstante, ambas condiciones desarrollaron mayormente texturas semialgodonosas (SC) y algodonasas (C) con diferencias notables al resto de texturas miceliales.

Tabla 7: Textura micelial de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos y periodos de incubación con oscuridad constante.

Medio	Semana							
	1	2	3	4	5	6	7	8
WA	F	F	F	F	F	F	F	F
PA	C	SC	SC	SC	SC/C	SC/C	SC/C	SC/C
MA	C	SC/C	SC/C	C	C	C	C	C
MEA	C	C	C	C	C	C	C	C
YMA	C	SC	SC	SC	C	C	C	C
CDA	F	F/SC	SC	C	C	C	C	C
PDA	SC/C	SC	SC	C	C	C	C	C
SDA	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
SDYA	SC/C	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
SDMA	SC	SC	SC	SC	SC	C	C	C
YPGA	SC/C	SC	SC	SC	SC	SC/C	SC/C	SC/C
CDYA	F/SC	F	F	F	F/SC	SC	SC/C	C
WA+I	SC	F/SC	F/SC	F	F	F	F	F
SDMA+I	SC	F/SC	SC	SC	SC	SC	C	C
YMA+I	SC/C	SC	SC	SC	SC	SC	C	C
CDA+I	SC	F	F	F/SC	C	C	C	C
CDYA+I	F/SC	F	F	F	F/SC	F/SC	SC	SC

F Lisa, SC Semialgodonosa, C Algodonosa.

La densidad y textura micelial durante el crecimiento de *Cordyceps* sp. tuvo una relación positiva de incremento a lo largo del periodo de incubación bajo iluminación y oscuridad constantes. Pero las colonias en los medios CDA y aquellos suplementados con malta llegaron a una densidad abundante y textura algodonsa más rápido que los demás, con la diferencia de que los de CDA comenzaban a partir de densidades pobres y con texturas lisas y los de malta lo hicieron desde densidades moderadas y con texturas semialgodonosas. Sin embargo, esa relación positiva no se presentó con los medios. Los medios suplementados con integumento

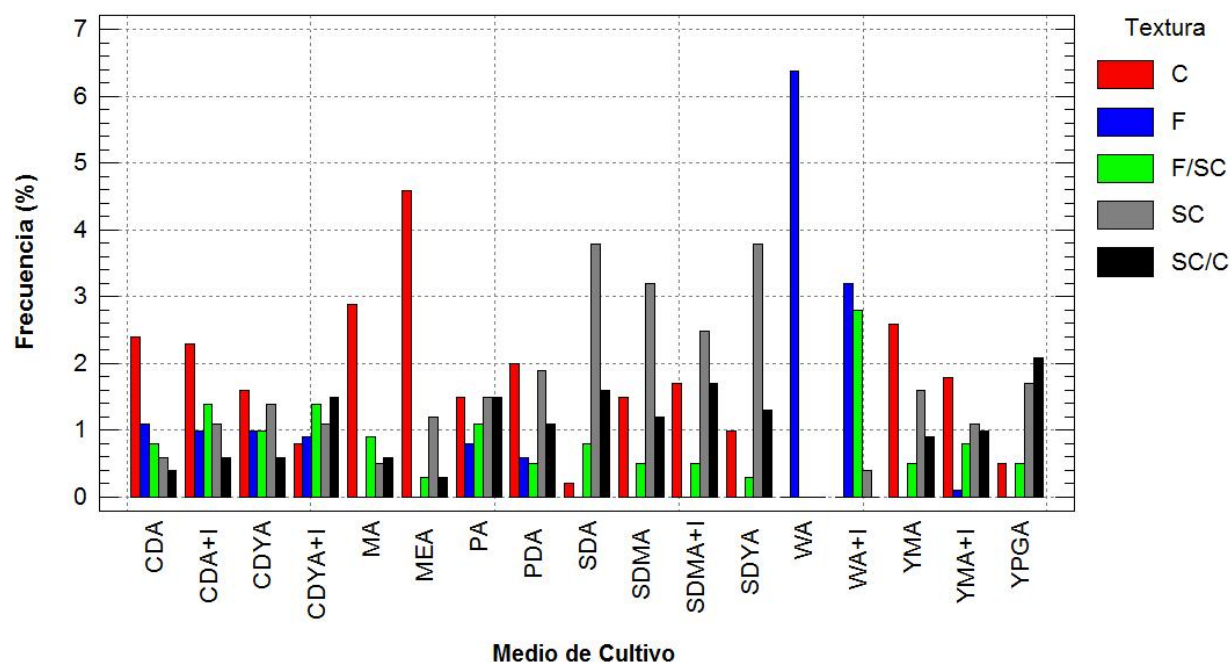


Fig. 10: Textura micelial de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos de cultivo después de ocho semanas de incubación con iluminación y oscuridad constantes. El gráfico muestra la frecuencia en porcentaje de cada categoría de textura micelial de acuerdo con el medio de cultivo. Textura: F Lisa, SC Semialgodonosa, C Algodonosa. (χ^2 ; $P \leq 0.01$).

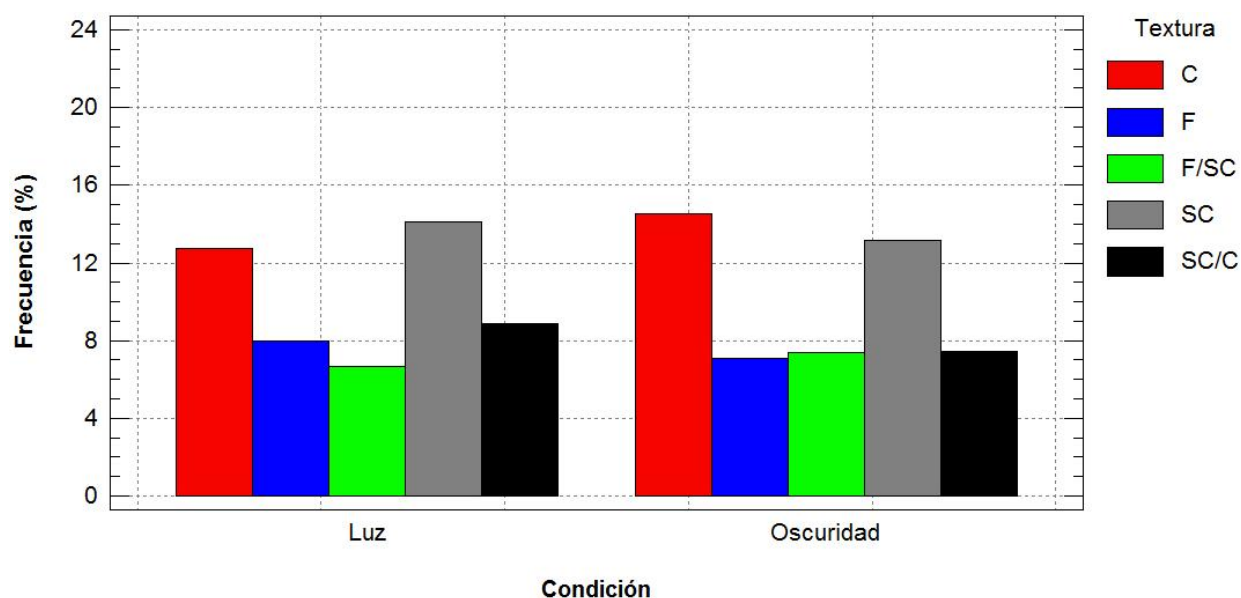


Fig. 11: Textura micelial de *Cordyceps* sp. después de ocho semanas de incubación con iluminación y oscuridad constantes. El gráfico muestra la frecuencia en porcentaje de cada categoría de textura micelial de acuerdo con la condición de cultivo. Textura: F Lisa, SC Semialgodonosa, C Algodonosa. (χ^2 ; $P \geq 0.10$).

también tuvieron un incremento mayor en sus densidades y texturas miceliales con respecto a los que no se suplementaron con este.

8.4. Crecimiento Radial de *Cordyceps* sp.

Los diámetros promedios de las colonias cultivadas en diferentes medios por cada semana de incubación bajo luz y oscuridad constantes de *Cordyceps* sp. son dados en las Tablas 8 y 9 respectivamente.

La tasa de crecimiento radial (mm/semana) de *Cordyceps* sp. fue diferencialmente influenciada por el medio (F ; $P = 0,0001$) (Fig. 12), y por la condición de cultivo (F ; $P = 0,0001$) (Fig. 13), y estos factores de crecimiento actuaron independientemente uno del otro (F ; $P = 0,0265$) (Fig. 14).

Después de ocho semanas de incubación bajo luz, el crecimiento radial de las colonias fue alto en CDA+I y en CDYA+I ($11,84 \pm 0,31 - 11,92 \pm 0,78$ mm/semana) (promedio \pm desviación estándar), seguidos por SDYA, CDA, WA+I, y YMA+I; el menor crecimiento se presentó en WA ($5,23 \pm 0,97$ mm/semana); y el resto de las colonias y medios tuvo un crecimiento radial intermedio ($7,52 \pm 0,93 - 8,83 \pm 1,10$ mm/semana). Bajo incubación en oscuridad, el crecimiento radial de las colonias fue alto también en CDA+I y CDYA+I ($13,46 \pm 0,37 - 13,96 \pm 0,23$ mm/semana), seguido de varios medios con crecimientos parecidos ($10,60 \pm 1,50 - 12,57 \pm 0,16$), sólo en WA se presentó bajo ($6,18 \pm 0,58$ mm/semana); y en PA, PDA, y SDYA intermedio ($8,01 \pm 1,14 - 9,93 \pm 1,00$ mm/semana) (Tabla 10).

En términos de medio de cultivo, sorpresivamente WA+I produjo un alto crecimiento radial que la mayoría, y el mismo medio sin integumento tuvo el menor rendimiento. Aunque medios como CDA y CDYA que presentaron diámetros grandes fueron superados por los mismos medios con integumento; así ocurrió con SDMA y YMA (Fig. 12). Igualmente, cuando se compararon las condiciones de incubación con todos los medios agrupados, en oscuridad se indujo significativamente un mayor crecimiento radial de las colonias que aquellas puestas en luz (Fig. 13) a excepción de SDYA; y PDA y WA mantuvieron esas diferencias pero no fueron significativas (Fig. 14) (Tabla 10).

Tabla 8: Crecimiento diametral de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos y periodos de incubación con iluminación constante.

Medio	Semana							
	1	2	3	4	5	6	7	8
WA	5,1 ± 0,5 *	11,1 ± 0,6	16,6 ± 0,5	22,1 ± 1,5	28,1 ± 6,0	33,0 ± 7,1	36,4 ± 8,1	38,7 ± 8,3
PA	11,4 ± 1,0	17,9 ± 0,5	21,5 ± 1,1	27,5 ± 0,9	41,0 ± 1,1	47,2 ± 4,8	53,2 ± 9,2	56,5 ± 12,5
MA	7,5 ± 0,6	13,2 ± 0,9	17,7 ± 1,0	28,2 ± 1,5	36,4 ± 1,2	49,7 ± 4,2	62,8 ± 9,2	70,5 ± 10,8
MEA	10,6 ± 0,7	18,8 ± 0,5	25,3 ± 0,5	30,5 ± 0,9	41,1 ± 1,0	48,7 ± 1,6	63,8 ± 3,0	75,7 ± 4,2
YMA	10,1 ± 1,0	17,0 ± 1,7	22,5 ± 2,8	28,2 ± 3,1	38,4 ± 3,1	45,4 ± 4,9	57,9 ± 6,2	70,8 ± 5,5
CDA	7,0 ± 0,1	17,0 ± 0,5	24,3 ± 1,4	42,7 ± 1,9	53,4 ± 1,6	68,4 ± 2,2	82,2 ± 1,6	88,3 ± 2,4
PDA	7,4 ± 0,3	12,9 ± 1,0	17,1 ± 0,4	27,8 ± 0,6	36,3 ± 1,5	49,7 ± 2,6	62,4 ± 4,3	73,5 ± 5,4
SDA	11,3 ± 0,6	19,6 ± 1,1	24,0 ± 1,6	28,5 ± 4,6	35,8 ± 5,7	43,7 ± 5,3	52,9 ± 3,6	64,8 ± 1,4
SDYA	11,4 ± 0,3	21,9 ± 0,8	27,9 ± 2,4	42,2 ± 3,1	54,4 ± 2,7	67,4 ± 1,7	79,4 ± 5,2	85,3 ± 4,6
SDMA	14,3 ± 0,5	25,0 ± 0,9	29,8 ± 2,4	33,5 ± 4,3	42,5 ± 7,7	50,4 ± 11,4	61,1 ± 20,0	69,6 ± 23,1
YPGA	11,5 ± 0,5	21,5 ± 0,6	27,0 ± 0,6	33,9 ± 0,3	43,6 ± 1,2	52,3 ± 3,5	61,7 ± 10,5	70,8 ± 16,1
CDYA	11,7 ± 1,1	19,3 ± 1,2	26,0 ± 2,1	31,9 ± 1,9	43,2 ± 1,7	49,6 ± 1,9	60,8 ± 3,9	71,4 ± 5,8
WA+I	5,7 ± 0,2	12,8 ± 0,5	25,6 ± 1,0	39,4 ± 1,4	53,4 ± 2,6	66,4 ± 4,7	72,1 ± 9,1	74,1 ± 10,9
SDMA+I	8,7 ± 0,6	21,8 ± 0,7	29,1 ± 2,6	34,9 ± 5,2	41,6 ± 8,6	47,8 ± 11,4	54,7 ± 15,7	61,9 ± 20,7
YMA+I	7,2 ± 0,4	19,0 ± 1,1	29,5 ± 0,5	38,4 ± 5,0	48,6 ± 6,2	60,3 ± 8,9	75,0 ± 8,9	84,1 ± 4,1
CDA+I	7,4 ± 1,0	23,9 ± 1,0	39,6 ± 2,1	52,4 ± 4,5	62,8 ± 4,5	73,9 ± 6,3	83,7 ± 7,6	88,2 ± 3,6
CDYA+I	8,6 ± 0,2	23,0 ± 2,7	38,3 ± 1,2	50,0 ± 3,6	61,4 ± 3,8	72,7 ± 2,6	83,2 ± 1,7	90,0 ± 0,0

* Diámetro promedio de la colonia (mm ± SD). El diámetro de la colonia fue medido en los ejes X y Y trazados en cada caja Petri y en cuádruple por cada medio sólido.

Tabla 9: Crecimiento diametral de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos y periodos de incubación con oscuridad constante.

Medio	Semana							
	1	2	3	4	5	6	7	8
WA	14,0 ± 1,2 *	19,4 ± 2,1	24,6 ± 2,9	27,6 ± 2,5	32,4 ± 2,0	35,6 ± 2,5	40,2 ± 5,6	45,7 ± 7,6
PA	20,1 ± 1,3	28,6 ± 2,8	36,9 ± 5,5	43,5 ± 7,6	53,8 ± 9,5	62,7 ± 6,4	67,5 ± 4,9	68,3 ± 4,2
MA	18,7 ± 0,6	31,8 ± 1,0	44,7 ± 0,9	52,8 ± 1,3	61,3 ± 0,3	71,4 ± 2,6	85,2 ± 4,2	90,0 ± 0,0
MEA	14,8 ± 1,6	25,5 ± 1,5	34,4 ± 1,7	41,7 ± 2,3	52,1 ± 3,8	64,5 ± 9,2	79,8 ± 7,0	89,5 ± 0,9
YMA	16,5 ± 1,2	27,1 ± 1,2	34,6 ± 1,2	41,8 ± 2,4	52,4 ± 1,9	64,6 ± 2,3	77,0 ± 2,3	81,0 ± 2,0
CDA	23,9 ± 1,7	39,6 ± 3,7	49,3 ± 4,5	56,4 ± 4,6	62,4 ± 5,0	71,4 ± 3,9	78,7 ± 5,0	89,1 ± 1,3
PDA	12,2 ± 0,8	19,5 ± 1,4	27,0 ± 5,6	33,5 ± 1,5	42,8 ± 1,3	52,0 ± 1,3	60,5 ± 2,3	67,4 ± 3,1
SDA	20,5 ± 0,7	34,2 ± 1,5	42,3 ± 2,7	51,1 ± 3,8	61,2 ± 5,4	68,8 ± 6,1	75,1 ± 6,3	80,2 ± 7,4
SDYA	13,2 ± 1,7	23,2 ± 1,9	26,8 ± 2,9	33,1 ± 4,8	40,8 ± 5,9	46,6 ± 5,8	55,6 ± 9,0	61,1 ± 10,6
SDMA	25,1 ± 1,7	36,7 ± 3,0	44,6 ± 7,0	53,3 ± 11,3	61,9 ± 14,7	67,2 ± 16,0	73,9 ± 17,7	81,2 ± 14,1
YPGA	20,0 ± 0,9	31,1 ± 4,0	37,2 ± 5,4	43,1 ± 5,1	53,5 ± 7,7	65,4 ± 11,9	72,8 ± 11,5	78,3 ± 9,4
CDYA	24,8 ± 0,8	35,2 ± 1,2	44,9 ± 1,5	51,2 ± 2,2	57,9 ± 0,5	66,0 ± 5,0	74,8 ± 5,4	84,2 ± 2,9
WA+I	22,5 ± 4,1	38,0 ± 5,7	50,8 ± 5,9	56,5 ± 5,5	65,7 ± 3,5	71,6 ± 5,0	74,3 ± 7,8	74,3 ± 7,8
SDMA+I	21,8 ± 0,6	36,9 ± 0,7	48,8 ± 1,6	58,0 ± 1,8	66,9 ± 0,9	74,5 ± 1,4	84,2 ± 1,6	90,0 ± 0,0
YMA+I	13,8 ± 0,5	29,0 ± 1,2	41,9 ± 2,4	52,0 ± 3,1	64,3 ± 3,6	74,2 ± 3,1	83,7 ± 1,2	88,2 ± 1,8
CDA+I	14,1 ± 1,2	38,6 ± 2,1	57,7 ± 1,8	71,5 ± 1,8	84,2 ± 5,1	87,7 ± 4,6	90,0 ± 0,0	90,0 ± 0,0
CDYA+I	15,3 ± 0,6	37,3 ± 1,0	52,5 ± 2,9	65,6 ± 4,4	76,8 ± 3,2	84,6 ± 5,2	89,3 ± 1,1	90,0 ± 0,0

* Diámetro promedio de la colonia (mm ± SD). El diámetro de la colonia fue medido en los ejes X y Y trazados en cada caja Petri y en cuádruple por cada medio sólido.

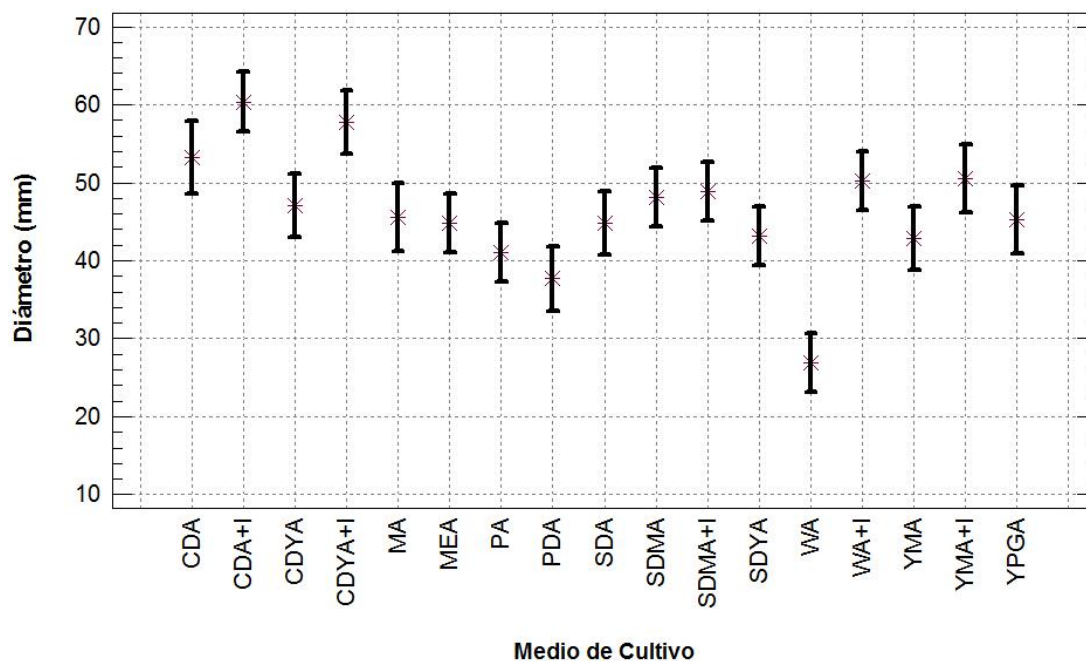


Fig. 12: Diámetro promedio en el crecimiento de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos de cultivo después de ocho semanas de incubación con iluminación y oscuridad constantes. El gráfico muestra el diámetro promedio de las colonias de acuerdo con el medio de cultivo. (F ; $P \leq 0.01$).

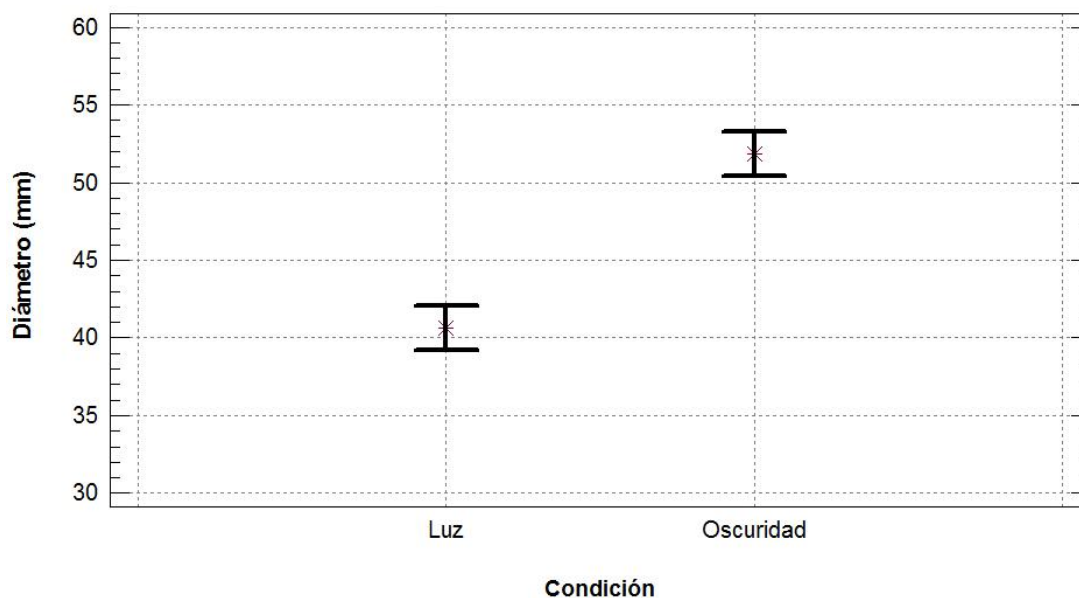


Fig. 13: Diámetro promedio en el crecimiento de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos de cultivo después de ocho semanas de incubación con iluminación y oscuridad constantes. El gráfico muestra el diámetro promedio de las colonias de acuerdo con la condición de cultivo. (F ; $P \leq 0.01$).

El coeficiente de determinación (r^2) indicó un buen ajuste de la ecuación de regresión lineal ($y=a+bx$) evaluando el modelo y la tasa de crecimiento radial sobre las colonias de *Cordyceps* sp. Sin embargo, una variación en la pendiente se encontró en MA (0,97), PDA (0,96), SDMA (0,97), WA+I (0,97) incubados en luz, y en la mayoría de los medios incubados en oscuridad (0,78 – 0,97) excepto MEA, YMA, PDA, y YMA+I, en comparación del 98 – 99 % de ajuste de las tasas de crecimiento radial centradas en la condición de luz (Tabla 10). Principalmente, esa variación de la pendiente demostró la irregularidad del crecimiento radial de *Isaria* sp. en algún momento durante las ocho semanas de cultivo debido a que las colonias MA (0,97), CDA+I (0,86), SDMA+I (0,92), y CDYA+I (0,90) incubadas en oscuridad sobrepasaron el espacio de la cajas Petri (90 mm); en MA (0,97), PDA (0,96), y SDMA (0,97) incubadas en luz y WA (0,88), CDA (0,89), SDA (0,92), SDYA (0,97), SDMA (0,87), YPGA (0,95), CDYA (0,90), y SDMA+I (0,92) incubadas en oscuridad sostuvieron semanas de crecimiento más rápido que otras; y PA en oscuridad (0,91), WA+I en luz (0,97) y oscuridad (0,78) obtuvieron su senescencia (Fig. 15 en Anexos).

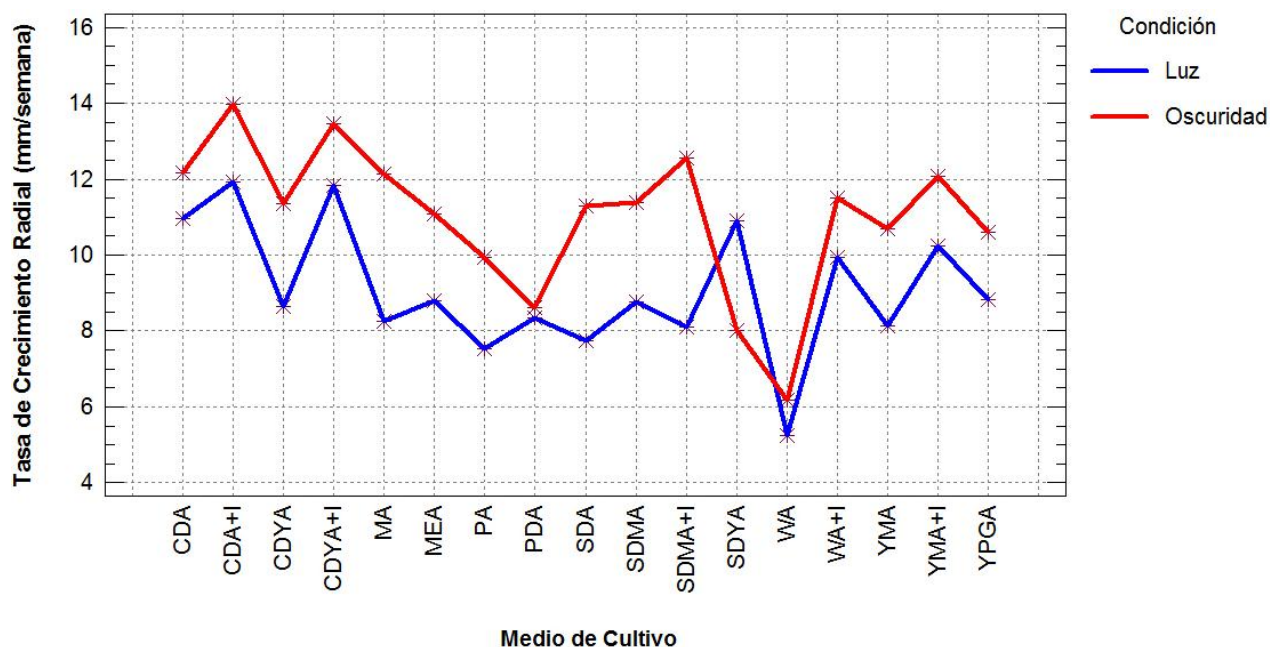


Fig. 14: Tasa de crecimiento radial promedio de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos de cultivo después de ocho semanas de incubación con iluminación y oscuridad constantes. La tasa de crecimiento radial (K_r) fue calculada a través de la ecuación de regresión lineal ($y=a+bx$) con los diámetros X e Y semanales de cada colonia con cuatro réplicas por medio sólido en las condiciones de iluminación y oscuridad constantes. (F ; $P \leq 0.05$).

Sobresalen los medios CDA+I y CDYA+I por presentar las tasas de crecimiento diametral más altas en ambas condiciones de incubación.

Tabla 10: Tasa de crecimiento diametral de *Cordyceps* sp. en diferentes medios sólidos después de ocho semanas de incubación con iluminación y oscuridad constantes.

Medio	Luz		Oscuridad	
	K_r	r^2	K_r	r^2
WA	5,23 ± 0,97 ^{a*}	0,99 ^{**}	6,18 ± 0,58 ^a	0,88
PA	7,52 ± 0,93 ^b	0,98	9,93 ± 1,00 ^c	0,91
MA	8,25 ± 0,93 ^b	0,97	12,15 ± 0,20 ^{efgh}	0,97
MEA	8,80 ± 0,27 ^{bcd}	0,98	11,07 ± 0,68 ^{cdef}	0,99
YMA	8,14 ± 0,49 ^b	0,98	10,68 ± 0,28 ^{cde}	0,98
CDA	10,97 ± 0,03 ^{ef}	0,98	12,16 ± 0,61 ^{fgh}	0,89
PDA	8,34 ± 0,48 ^b	0,96	8,60 ± 0,24 ^b	0,99
SDA	7,75 ± 0,45 ^b	0,98	11,30 ± 0,93 ^{defg}	0,92
SDYA	10,89 ± 0,49 ^{ef}	0,99	8,01 ± 1,14 ^b	0,97
SDMA	8,76 ± 2,23 ^{bcd}	0,97	11,40 ± 2,33 ^{defg}	0,87
YPGA	8,83 ± 1,10 ^{bcd}	0,99	10,60 ± 1,50 ^{cd}	0,95
CDYA	8,66 ± 0,31 ^{bc}	0,99	11,36 ± 0,39 ^{defg}	0,90
WA+I	9,95 ± 0,96 ^{cde}	0,97	11,52 ± 0,63 ^{defg}	0,78
SDMA+I	8,10 ± 2,01 ^b	0,98	12,57 ± 0,16 ^{gh}	0,92
YMA+I	10,24 ± 0,96 ^{de}	0,99	12,07 ± 0,22 ^{defgh}	0,98
CDA+I	11,92 ± 0,78 ^f	0,99	13,96 ± 0,23 ⁱ	0,86
CDYA+I	11,84 ± 0,31 ^f	0,99	13,46 ± 0,37 ^{hi}	0,90

* Tasa de crecimiento radial promedio de la colonia (mm/semana ± SD). La tasa de crecimiento radial (K_r) fue calculada a través de la ecuación de regresión lineal ($y=a+bx$) con los diámetros X e Y semanales de cada colonia con cuatro réplicas por medio sólido en las condiciones de iluminación y oscuridad constantes.

** El coeficiente de determinación (r^2) fue usado para evaluar la bondad de ajuste de la regresión lineal. Las tasas de crecimiento radial dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes. (LSD; $P \leq 0.05$).

9. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que la luz visible y la oscuridad, así como la composición de los medios sólidos pueden tener un efecto en el crecimiento micelial de *Cordyceps* sp. Estos resultados corroboran las conclusiones previas observadas por Shim et al., (2003) en *Cordyceps fumosorosea*; Shrestha et al., (2006), y Dong et al., (2012), (2013), en *C. militaris*; Sung et al., (2010) en *C. cardinalis*; Oh et al., (2014) en *C. pruinosa*; y Chiriví et al., (2017), en *C. nidus*.

Los medios de cultivo sólido fueron utilizados para evaluar las diferentes características de crecimiento de *Cordyceps* sp. porque permitieron monitorear y observar las variaciones entre las colonias en los diferentes intervalos de tiempo durante su cultivo. Los medios sólidos pueden ser más acertados que los líquidos para estudiar las características de crecimiento de hongos como *Cordyceps* que no son acuáticos en su hábitat natural (Shrestha et al., 2006).

9.1. Morfología de *Cordyceps* sp.

Los estados anamorfos isariformes de *Cordyceps* s. s. usualmente producen sinemas conspicuos y ramificados sobre el insecto hospedero con las estructuras reproductivas en los ápices de estos, las hifas son comúnmente hialinas y lisas, los conidióforos son constituidos por verticilos de fiálides que tienen las bases hinchadas y terminando con ápices como cuellos delgados, y a partir de las cuales produce cadenas divergentes de conidios con formas diversas de acuerdo a la especie (Brown y Smith, 1957; Samson, 1974; Liang, 1981; Luangsa-ard et al., 2005; Humber, 2012). *Cordyceps* sp. presentó dichas características, y la forma de los conidios se encontró estrechamente relacionada con los de *C. cateniobliqua*, *C. cateniannulata*, *C. amoenerosea*, *C. fumosorosea*, y *C. niphetodes*, aunque sus medidas fueron inferiores con estas especies. Las medidas de las fiálides se encontraron intermedias con las especies *C. cateniobliqua*, *C. cateniannulata* y *C. amoenerosea*.

Sin embargo, después del aislamiento sobre medios sólidos, la coloración del anverso de las colonias de *Cordyceps* sp. incubadas en oscuridad fueron rosadas a rojizas y esto ha sido reportado también en *C. cateniobliqua*, *C. amoenerosea*, y *C. fumosorosea*, y no en *C. niphetodes* ni en *C. cateniannulata* que son blancas (Samson, 1974; Liang, 1981). Pero estas especies además se pueden diferenciar por el color que presenten las colonias en su reverso (Chen et al., 2010). *Cordyceps* sp. presentó amarillo anaranjado a rosa púrpura en CDA, igual

que *C. catenibliqua* (Liang, 1981), y en MA fue amarillo crema a anaranjado rosado, mientras que *C. amoenerosea* es crema a rojo en MA, y en *C. fumosorosea* es blanco a amarillo (Samson, 1974). Por otro lado, el diámetro de la colonia de *Cordyceps* sp. fue de 35 – 43 mm en CDA y 31 – 32 mm en MA después de dos semanas de cultivo a 27 ± 2 °C. Cercano a estos diámetros estuvieron las colonias de *C. catenibliqua*, *C. amoenerosea* y *C. fumosorosea* pero incubadas a 25°C. Aunque la temperatura de incubación de *Cordyceps* sp. fue un poco mayor y afecta su crecimiento, los diámetros de las colonias de las demás especies estuvieron significativamente distantes.

En el hospedero, *Cordyceps* sp. produjo sinemas anaranjadas a rojizos con ápices blancos y pulverulentos por la conidiación, igualmente sucede en *C. catenibliqua* y *C. amoenerosea*, mientras que *C. fumosorosea* ambas zonas son rosadas. De otro lado, *Cordyceps* sp., *C. catenibliqua* y *C. amoenerosea* se encontraron hospedando en insectos del orden Lepidoptera. Además, *Cordyceps* sp. desarrolló en CDA y MA micelio pulverulento debido al desarrollo de estructuras conidiogénicas, y sinemas fértiles como lo reporta Samson (1974) para *C. catenibliqua* y *C. amoenerosea*.

En este caso, las descripciones morfológicas de *Cordyceps* sp. concuerdan con estos dos taxones: *C. catenibliqua* y *C. amoenerosea*, pero para poderlo ubicar en una de las dos especies se hace necesario realizar una caracterización molecular.

9.2. Pigmentación de *Cordyceps* sp.

Hoy en día se conoce que el micelio de algunos hongos con colores vistosos produce mayor su pigmentación cuando es expuesto a la luz visible. *Cordyceps militaris* es un hongo entomopatógeno amarillo y anaranjado cuando crece con luz blanca, pero incoloro en oscuridad (Shrestha et al., 2005, 2006). Un efecto metabólico de la luz blanca en los hongos es la inducción a la síntesis de carotenoides, que son las moléculas principalmente causantes de la pigmentación amarilla, anaranjada y roja de los hongos, que sirven de defensa del daño que pudiera ocasionar las radiaciones, y su acumulación es debido a los largos periodos de exposición produciéndose mayor coloración y protección (Carlile et al., 2001; Shrestha et al., 2005, 2006).

En general, las colonias de *Cordyceps* sp. incubadas bajo luz constante produjeron coloraciones intensas entre anaranjado y rojo en comparación con aquellas que fueron cultivadas en oscuridad que presentaron en su mayoría micelio blanco, aunque las colonias en MA, MEA, CDA, PDA y SDMA tuvieron tonos rosados. Sin embargo, el micelio de *Cordyceps*

sp. podría contener pigmentos aun creciendo en oscuridad pero con una cantidad mucho menor como lo reporta Babitha et al., (2008) para el cultivo del ascomiceto *Monascus purpureus*. Además de la respuesta fisiológica, la presencia o ausencia de estos pigmentos ayudaron en la taxonomía de *Cordyceps* sp., como lo mencionaron Leach (1971), Valadon (1976), Chen et al., (2010), y Chiriví et al., (2017) para otros hongos.

De los medios evaluados en presencia de la luz, los que fueron compuestos con extracto de levadura y peptona favorecieron la producción de pigmentos anaranjados a rojos intensos en *Cordyceps* sp., especialmente los que contenían mayores concentraciones como PA, YMA SDYA, y YPGA. Esto ha sido reportado que el extracto de levadura y la peptona usados como fuentes de nitrógeno orgánico proporcionan otros nutrientes, principalmente aminoácidos y péptidos, que incrementan considerablemente la producción de pigmentos en muchas especies de hongos (Cho et al., 2002; Shrestha et al., 2006; Costa et al., 2016; Chiriví et al., 2017). Sin embargo, estos mismos medios no produjeron ningún tipo de pigmentación en las colonias de *Cordyceps* sp. cuando estas se incubaron en oscuridad. Ya que los sistemas receptores a la luz de los hongos son conformados por proteínas, esto sugiere que la luz como estimulante y el extracto de levadura y la peptona como nutrientes polipeptídicos son promotores en activar la producción y acumulación de pigmentos en este aislamiento de *Cordyceps* sp. a través del metabolismo del nitrógeno, aminoácidos y péptidos para el desarrollo estructural de dichas proteínas fotoreceptoras.

Otra razón por la que sea posible la producción alta de pigmentos es la relacionada con la producción de polifenoles, un importante metabolito secundario constituyente del micelio para protección antioxidante, cuando el hongo es cultivado en medios sintéticos enriquecidos. Chiriví et al., (2017) demostró con *C. nidus*, un hongo de micelio rojo, el incremento en la producción de polifenoles así como la pigmentación conforme transcurre el tiempo de cultivo en SDYA, recomendando a su vez este tipo de medios para mejorar su obtención.

En CDA, la pigmentación de *Cordyceps* sp. fue anaranjada y estuvo restringida hacia el centro de las colonias incubadas con luz. CDA es un medio con sales basales principalmente y por ende contiene nitrógeno inorgánico en pocas cantidades, esto pudo favorecer en algo la pigmentación. De acuerdo con Sung et al., (2010) *C. cardinalis* lo produjo.

Otro factor importante que influye en la pigmentación de los hongos son los bioelementos que pueda contener el medio (Cho et al., 2002; Hyun et al., 2013). CDA contiene hierro, magnesio y potasio y esto puede afectar negativamente la síntesis de pigmentos. Según Cho et al., (2002), *I. sinclairii* en medios con presencia del hierro, desvió la contribución del metabolito para el desarrollo de la pigmentación hacia la producción de energía de las células haciendo

que sus colonias fueran decoloradas. En nuestro caso, cuando se le agregó extracto de levadura al medio de CDA (CDAY), *Cordyceps* sp. presentó un incremento considerable de coloración en las colonias incubadas con luz pero estas fueron más decoloradas en oscuridad en comparación a la coloración presentada en CDA cultivadas bajo las mismas condiciones. Al parecer, el extracto de levadura y la peptona potencializa el desarrollo de pigmentos en condiciones de luz pero es inversamente proporcional en oscuridad.

Estos efectos son comunes entre las especies de *Cordyceps* cuando son cultivadas sobre medios con altas concentraciones de nitrógeno e influenciadas con la luz blanca. No obstante, en casos particulares como *Beauveria bassiana*, no se observaron diferencias de pigmentación cuando sus colonias fueron cultivadas sobre SDYA en condiciones de luz y oscuridad constantes, produciendo colonias amarillas con centros blancos (Hyun et al., 2013).

Medios como MA y PDA que no fueron suplementadas con extracto de levadura y peptona, también produjeron pigmentación en *Cordyceps* sp. incubadas con luz pero no mayor a los medios constituidos por extracto de levadura y/o peptona. Esta coloración fue principalmente anaranjada y pudo tener rutas metabólicas diferentes para su producción por la composición del medio. Pradeep y Pradeep, (2013) y Costa et al., (2016) mencionan que el extracto de malta y el extracto de papa, fuentes enriquecidas de carbonos simples principalmente, es también fuente de vitaminas y coenzimas que pueden promover el crecimiento y también la producción de pigmentos en hongos filamentosos. De ahí, que la sacarosa como la única fuente directa de carbono en CDA pudo haber contribuido también para el desarrollo de la pigmentación en ambas condiciones de luz y oscuridad.

Sin embargo, otras especies de hongos aprovechan de modo distinto las fuentes de carbono. *I. sinclairii* fue evaluada para producir pigmentos rojos en medios con diferentes fuentes de carbono incubadas bajo oscuridad donde el extracto de malta fue el que menos produjo y la sacarosa tuvo una producción media (Cho et al., 2002). De ahí, que el sustrato nutricional y el metabolismo para la síntesis de pigmentos es característico de cada especie.

También se debe considerar que otros pigmentos no carotenoides como las quinonas se presentan en los hongos y que estas son producidas en respuesta a las concentraciones de carbono y nitrógeno sin la presencia de la luz, tal es el caso del hongo anamorfo *Fusarium oxysporum* que desarrolla un micelio rosado cultivado en oscuridad (Carlile, 1965; Leach, 1971).

Las observaciones también sugieren que las esporas de *Cordyceps* sp. al ser siempre blancas o incoloras bajo exposición de la luz visible no contienen carotenoides ni otro tipo de pigmentos, pero esto no es atribuible para todos los hongos. *Neurospora crassa* es un hongo

anamorfo bastante estudiado por los efectos que le ocasiona la luz y sus conidios contienen carotenoides y esto le da pigmentación cuando crece en oscuridad, pero en el micelio requiere de la luz (Zalokar, 1954; Carlile, 1965; Gmoser et al., 2017). *Metarhizium anisopliae*, un hongo entomopatógeno ubicado en *Cordyceps sensu lato*, produce pigmentación verde en los conidios que le proporciona protección frente a las radiaciones de la luz (Braga et al., 2006).

Estos efectos en las colonias indicaron que la nutrición utilizada y la luz favorecieron la producción de pigmentos para este aislamiento, aunque todos los medios estaban compuestos por diferentes fuentes de carbono, la mayoría de nitrógeno y algunos con sales basales, se demostró que las diferentes proporciones nutricionales favorecieron la producción de algunos pigmentos sobre otros. En este sentido, Costa et al., (2016) demostró que *Aspergillus aureolatus* produjo un pigmento verde oscuro en un medio líquido de extracto de papa y dextrosa (PD) que no fue observado en otros medios. *Monascus purpureus* produce pigmentos de diferentes tonalidades dependiendo de la composición del medio (Mukherjee y Singh, 2011). Igualmente, varias especies de *Cordyceps* s. s. promueven su pigmentación de acuerdo a los medios y condiciones de cultivo (Shrestha et al., 2006; Sung et al., 2010; Dong et al., 2013; Oh et al., 2014; Chiriví et al., 2017)

Estos resultados son importantes para establecer otras investigaciones de tipo genético y metabólico, ya que si este aislamiento se ubica en *C. amoenerosea* o *C. catenibliqua* está relacionado filogenéticamente, de una manera muy cercana, con hongos entomopatógenos como *C. militaris* y *C. sinensis*, las especies más estudiadas y utilizadas de este género para fines medicinales (Sung et al., 2007; Kepler et al., 2017; Olatunji et al., 2018). Las evaluaciones de cultivo de este tipo son escasas para ambas especies, y podría representar el principio de una discusión acerca de las condiciones nutricionales para la producción de pigmentos y/o de compuestos activos con importantes aplicaciones biotecnológicas. Posteriormente, se podría concluir su posible producción industrial como ha sucedido con otras especies del mismo género con pigmentaciones intensas y bastante estudiadas (Cho et al., 2002; Shrestha et al., 2006; Sung et al., 2010; Molnár et al., 2010; Olatunji et al., 2018).

9.3. Crecimiento Micelial de *Cordyceps* sp.

Se observó que *Cordyceps* sp. crece en un amplio rango de medios sólidos de cultivo, incluyendo en uno nutricionalmente pobre como WA, sugiriendo que este es un hongo fagótrofo facultativo en hábitos nutricionales. Esta facultad del hongo le podría permitir su desarrollo

sobre otros hospederos taxonómicamente cercanos, y aún sobre sustratos diferentes al de los insectos pudiendo conservarse en su hábitat natural cuando la población de estos es reducida.

Los estados asexuales de *Cordyceps* son considerados más generalistas con sus hospederos que sus estados sexuales (Vega et al., 2012; Hajek y Meyling, 2018), esto indica que *Cordyceps* sp. al crecer en todos los medios evaluados podría hacerlo también sobre diferentes especies de insectos. De hecho, es probable que *Cordyceps* sp. pertenezca a una de las dos especies, *C. amoenerosea* o *C. catenibliqua*, donde la primera ha sido recolectada hospedando sobre artrópodos de diferentes órdenes, mientras esta última sólo en Lepidoptera (Samson 1974; Liang, 1981). Por otro lado, Kamata (2000) y Hesketh et al., (2010) observaron que algunos hongos entomopatógenos pueden sobrevivir en el suelo o en los troncos de los árboles con un crecimiento micelial restringido por largos periodos de tiempo sin infectar a sus hospederos. Estos hongos también pueden existir como endófitos en un rango amplio de especies de plantas entrando a través de las hojas, tallos, semillas, y raíces permaneciendo ahí o moviéndose dentro de la planta de una manera saprófita por mucho tiempo (Butt et al., 2016; Hajek y Meyling, 2018). En este sentido, las especies de *Metarhizium* son casi exclusivamente encontradas en las raíces, mientras que *Beauveria bassiana* son encontradas por toda la planta (Behie et al., 2015), y muchos otros hongos tradicionalmente conocidos como patógenos de insectos actúan de este modo incluyendo *Cordyceps* isariformes (Vega et al., 2009).

Por otra parte, el incremento de la biomasa de *Cordyceps* sp. en los distintos medios no necesariamente resultó en la producción alta de pigmentos. En general, los pigmentos producidos por hongos filamentosos son metabolitos secundarios cuya producción usualmente comienza después del crecimiento, especialmente cuando entran a la fase estacionaria. Por lo tanto, la producción de biomasa y pigmentos de los hongos filamentosos puede no ser positivamente correlacionada (Costa et al., 2016; Chiriví et al., 2017). De esta manera, en PA, WA y WA+I, las colonias consiguieron su senescencia en la semana siete en ambas condiciones de incubación desarrollando poco micelio aéreo y radial, pero las colonias puestas en luz intensificaron su coloración roja.

El crecimiento micelial de *Cordyceps* sp. fue caracterizado por su densidad, textura y tasa de crecimiento radial como respuesta a la producción de biomasa sobre los distintos medios de cultivo e influenciada por las condiciones de luz y oscuridad constantes. El medio de cultivo cumple un papel importante para el crecimiento óptimo del micelio de acuerdo a las especies de hongos, pero la luz puede inducir o inhibir ese crecimiento (Shrestha et al., 2006).

MA resultó ser el medio que en oscuridad, *Cordyceps* sp. desarrolló una densidad abundante de micelio a partir de la primera semana, seguido tempranamente por MEA y luego

por los demás medios que estaban constituidos con extracto de malta. En presencia de la luz, el extracto de malta también actuó desarrollando densidades abundantes en las colonias, pero iniciando con los medios que en oscuridad tuvo dicho desarrollo al final del periodo de cultivo. La textura micelial tuvo una relación positiva a la densidad micelial. Este desarrollo fue acumulativo resultando en las mayores frecuencias de micelio abundante y textura algodonosa en los medios con extracto de malta. Las diferencias encontradas entre el desarrollo de densidad y textura micelial en medios conteniendo extracto de malta con los demás estarían asociadas a la composición química de los mismos. El extracto de malta es una fuente de carbonos simples, vitaminas, nitrógeno y coenzimas que favorecen el crecimiento de la mayoría de hongos ya que proporciona nutrientes en moléculas más simples, solubles y de fácil asimilación (Pradeep y Pradeep, 2013; Costa et al., 2016).

La densidad micelial y el diámetro de las colonias de *Cordyceps* sp. también tuvieron una relación positiva. La densidad abundante tuvo diámetros amplios, a excepción de WA, PA, WA+I, y en las primeras cinco semanas de CDA+I, CDYA+I, en ambas condiciones. El desarrollo de un micelio aéreo está dado por el aprovechamiento de los nutrientes disponibles y probablemente consume más tiempo, esto resultaría en un diámetro menor del crecimiento radial. En otras palabras, un medio pobre contiene menos nutrientes y el crecimiento va en una dirección radial generalmente rápido en búsqueda de nutrición. Por lo tanto, los medios pobres de nutrientes no pueden sostener una densidad micelial abundante pero si diámetros amplios (Shrestha et al., 2006). Por otro lado, el diámetro de la colonia en un tiempo determinado indica su velocidad o tasa de crecimiento radial. Ya que el extracto de malta promovió más la producción de micelio aéreo de *Cordyceps* sp. en los medios que lo contenían que los que no, y de manera similar sucedió con la tasa de crecimiento radial de las colonias. Sin embargo, CDA+I y CDYA+I tuvo una producción parecida de micelio aéreo, pero finalizando el tiempo de cultivo, lo que le permitió desarrollar los diámetros más amplios en cada semana especialmente al inicio y luego incrementando sus tasas de crecimiento radial.

El crecimiento micelial de *Cordyceps* sp. no solo se vio favorecido por la variedad y las grandes cantidades de carbono en los medios sino también por el contenido de nitrógeno. Medios que en su composición ya contenían nitrógeno y utilizando fuentes adicionales, como el extracto de levadura y la peptona, se lograron buenos crecimientos miceliales en la mayoría de las colonias. En hongos, la composición de medios completos varía de especie a especie, pero la mayoría de ellos contienen caseína hidrolizada, ácido nucleico de levadura hidrolizada, una mezcla sintética de vitaminas solubles en agua, y a lo mejor extracto de levadura o extracto de malta o ambos (Finchman et al., 1979, citado por Shrestha et al., 2006). En relación, Sung et

al., (2010) demostró que el mejor medio de crecimiento micelial de *Cordyceps cardinalis* estaba compuesto por 1 % de maltosa, 2 % de avena, 1 % de peptona, y 2 % de agar, obteniendo densidad abundante y mayor crecimiento diametral de las colonias. Igualmente, Shrestha et al., (2006) demostró que SDYA y CDYA son medios completos para el crecimiento de *Cordyceps militaris*. Al respecto, *Cordyceps* sp. creció mejor sobre SDYA y CDA+I. Las fuentes de carbono y nitrógeno orgánico son nutrientes importantes para el crecimiento micelial de los hongos entomopatógenos debido a su desarrollo natural sobre los insectos hospederos (Shrestha et al., 2006; Sung et al., 2010).

La importancia del carbono radica en que cerca de la mitad del peso seco de las células fúngicas contiene este elemento por ser estructural en su morfología, y por eso tiene un efecto directo sobre la producción de biomasa; y el nitrógeno contribuye a su asimilación y metabolismo. Sin embargo, la cantidad de carbono en un medio debe ser alta para *Cordyceps* sp. ya que en WA, PA y WA+I, confirma que los medios pobres resultaron en poco crecimiento del micelio, y más bien la exigencia de medios completos. Especies del mismo género confirman esas mismas exigencias nutricionales en el medio, además de proporciones particulares de las fuentes de carbono y nitrógeno. *I. sinclairii* e *I. fumosorosea* producen abundante micelio en medios ricos en carbono y nitrógeno pero los requerimientos nutricionales son diferentes entre las dos especies con respecto a las proporciones de sus fuentes (Cho et al., 2002; Shim et al., 2003).

El crecimiento micelial de *Cordyceps* sp. cambió no solo por el medio de cultivo sino también por las condiciones de luz y oscuridad. Las diferencias fueron constantes entre los medios semana tras semana incubados en luz y en oscuridad, siendo la densidad micelial abundante más dependiente por la luz y las tasas de crecimiento radial más altas en oscuridad. La luz constante puede ser una fuente directa de estrés para el hongo que también explicaría las disminuciones en las tasas de crecimiento radial de las colonias. Igualmente, la luz demostró inhibir la tasa de crecimiento radial en *C. militaris* con relación a las colonias cultivadas en oscuridad (Shrestha et al., 2006).

Sin embargo, en presencia de la luz, el micelio aéreo de las colonias en la mayoría de los medios fue abundante y acumulativo semana tras semana frente a las colonias cultivadas en su ausencia. Interesantemente, en SDA y SDYA fue notable ese crecimiento cuando se compararon entre las dos condiciones de incubación. En su revisión, Tisch y Schmoll (2010) encontraron que el metabolismo de las fuentes de carbono está sujeto por el tipo de esa fuente y está estrechamente influenciado por la luz, es decir, el desarrollo de los hongos está regulado directamente por la nutrición y la luz de un modo convergente. En el caso más drástico, la

asimilación de una cantidad grande de una sola fuente de carbono como la dextrosa de los medios SDA y SDYA fue mejor metabolizada con presencia de la luz que con oscuridad por parte de *Cordyceps* sp. Esto mismo fue confirmado en *C. militaris* (Shrestha et al., 2006) y en *C. pruinosa* (Oh et al., 2014).

10. CONCLUSIONES

El conocimiento de las características morfológicas de *Cordyceps* sp. fueron útiles para acercarnos a su identidad taxonómica y para comprender sus requerimientos de cultivo. Sus descripciones morfométricas, la coloración rojiza intensa en su hospedero y su crecimiento micelial en diferentes medios sólidos de cultivo bajo condiciones de luz y oscuridad constantes la ubicaron entre las especies *C. amoenerosea* y *C. cateniobliqua*. Factores ambientales durante el cultivo del hongo como la luz visible generó efectos considerables en su crecimiento en comparación con la oscuridad en cuanto a que la luz promovió la producción alta de pigmentos y la densidad micelial abundante, mas no en la tasa de crecimiento radial, y en la textura micelial no hubo diferencias. Sin embargo, la calidad del medio sólido también tuvo su influencia. Aunque *Cordyceps* sp. creció en todos los medios evaluados, aquellos que fueron enriquecidos con altas concentraciones y variadas fuentes de carbono y nitrógeno influyeron en el mejoramiento de la producción de pigmentos, densidad micelial, y tasa de crecimiento radial. En general, las diferencias fueron significativas principalmente entre las condiciones de luz y oscuridad constantes, de menor medida entre medios de cultivo. Estas diferencias pueden ser útiles de acuerdo al objetivo de producción micelial de *Cordyceps* sp., además de que los resultados de este estudio pueden ser extendidos para el cultivo de otras especies de hongos.

11. RECOMENDACIONES

La caracterización morfológica del espécimen de hongo entomopatógeno recolectado en el mariposario Amaranta de Colombia ayudó a ubicarlo taxonómicamente en el género *Cordyceps* s. s. con la aproximación de que sea la especie *C. cateniobliqua* o *C. amoenerosea*. Una vez

obtenida su descripción y a favor de su especificación completa es recomendable su caracterización molecular.

Diferente a las condiciones de crecimiento micelial de *Cordyceps* sp. del presente estudio, se puede complementar su caracterización con la evaluación de diferentes cepas y en diferentes gradientes ambientales de temperatura, humedad relativa, pH, e intensidad de luz visible, además de su cultivo en medios líquidos. En cuanto a la luz visible, también se podría evaluar bajo perfiles de luz/oscuridad 12/12 h y separándola en sus longitudes de onda como la ultravioleta, azul, verde, y roja para describir sus efectos. En dichos efectos también se podrían implementar otras formas de medición cuantitativas en la producción de biomasa, extracción de pigmentos y colorimetría.

12. AGRADECIMIENTOS

Este estudio contó con la colaboración de diferentes personas que a partir de sus conocimientos, experiencias y gran disposición asistieron en su realización y a quienes les tengo un memorable agradecimiento, especialmente a mi mentora la Dra. Tatiana Sanjuan quien me ha acompañado durante todo mi proceso de crecimiento profesional y me guió permanentemente en el desarrollo de la investigación. Al Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes LAMFU por permitir los espacios para mi aprendizaje sobre el manejo de los Hongos Entomopatógenos. A las profesoras Dra. Marleny Salazar Salazar y Lina María Arbeláez quienes me brindaron la información, el laboratorio, y los materiales esenciales para desarrollar el trabajo en la Planta Piloto de Alimentos de la Universidad del Quindío. A Diana Giraldo Montoya y Gloria Giraldo Montoya quienes me abrieron las puertas de su Mariposario Amaranta de Colombia brindándome los espacios necesarios para obtener las muestras del hongo.

De igual forma al Dr. Luis Hernando Hurtado Tobón, docente en Bioestadística del programa de Licenciatura en Matemáticas, que me brindó las herramientas para el análisis de los resultados. Al Dr. Bhushan Shrestha del Mushtech *Cordyceps* Institute por el asesoramiento en la comprensión de los resultados. A Daniel Alejandro Villegas, técnico operativo de la Universidad del Quindío, por la manufactura del circuito de iluminación. A la Dra. Liliana Tirado y a Andrés Medina Herrera del Instituto Interdisciplinario de las Ciencias de la Universidad del Quindío por el diagnóstico de las radiaciones electromagnéticas de la luz utilizada en la

investigación. A la docente Ángela María Morales Trujillo del Programa de Biología por su oportuna colaboración en las mediciones microscópicas. Y demás docentes y funcionarios del Programa de Biología y Licenciatura en Biología y Educación Ambiental de la Universidad del Quindío por brindarme las bases teóricas de mi formación profesional.

Las razones de mi agradecimiento son también personales. A Sheila Barrera Ovalle y Luz Marina Posada Cifuentes por brindarme el apoyo personal y familiar de una manera incondicional.

Parte de los resultados de esta investigación fueron presentados en el *IX Congreso Latinoamericano de Micología - CLAM IX*, llevado a cabo en la ciudad de Lima, Perú, en el mes de agosto de 2017.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Alexopoulos, C. J.; C. W. Moms & M. Blacwell. Introductory Mycology; Fourth Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. 879 pp.
- Atlas, R. M. 2010. Handbook of Microbiological Media; Fourth Edition. CRC Press; Taylor & Francis Group, LLC. BocaRaton, USA. 2043 pp.
- Babitha, S.; J. C. Carvahlo; C. R. Soccol & A. Pandey. 2008. Effect of Light on Growth, Pigment Production and Culture Morphology of *Monascus purpureus* in Solid-State Fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 2671–2675.
- Behie, S. W.; S. J Jones & M. J. Bidochka. 2015. Plant Tissue Localization of the Endophytic Insect Pathogenic Fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecol.*, 13: 112-119.
- Boomsma, J. J.; A. B. Jensen; N. V. Meyling & J. Eilenberg. 2014. Evolutionary Interaction Networks of Insect Pathogenic Fungi. *Annu. Rev. Entomol.*, 59: 467-85.
- Booth, C. 1971. Fungal Culture Media. En: Booth, C. (Ed.). Methods in Microbiology; Vol. 4. Academic Press. New York, USA. pp. 49-94.
- Bourdichon, F.; S. Casaregola; C. Farrokh; J. C. Frisvad; M. L. Gerds; W. P. Hammes; ... & E. B. Hansen. 2012. Food Fermentations: Microorganisms with Technological Beneficial Use. *Int. J. Food Microbiol.*, 154: 87-97.

- Braga, G. U. L.; D. E. N. Rangel; S. D. Flint; A. J. Anderson & D. W. Roberts. 2006. Conidial Pigmentation is Important to Tolerance Against Solar-Simulated Radiation in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochem. Photobio.*, 82: 418-422.
- Brown, A. H. S. & G. Smith. 1957. The Genus *Paecilomyces* Bainier and its Perfect Stage *Byssochlamys* Westling. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 40(1): 17-89.
- Butt, T. M.; C. J. Coates; I. M. Dubovskiy & N. A. Ratcliffe. 2016. Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. *Adv. Genet.*, 94: 01-58.
- Cabanillas, H. E. & W. A. Jones. 2009. Effects of Temperature and Culture Media on Vegetative Growth of an Entomopathogenic Fungus *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) Naturally Affecting the Whitefly, *Bemisia tabaci* in Texas. *Mycopathologia*, 167: 263-271.
- CARDER. 2013. Diagnóstico de Riesgos Ambientales del Municipio de Pereira, Risaralda. Corporación Autónoma Regional de Risaralda, CARDER. 65 pp.
- Carlile, M. J. 1965. The Photobiology of Fungi. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 16: 175-202.
- Carlile, M. J.; S. C. Watkinson & G. W. Gooday. 2001. The Fungi; Second Edition. Academic Press. London, UK. 610 pp.
- Castillo, L. P.; A. Osorio; N. Vargas; T. Sanjuan; A. Grajales & S. Restrepo. 2018. Genetic Diversity of the Entomopathogenic Fungus *Cordyceps tenuipes* in Forest and Butterfly Gardens in Quindío, Colombia. *Fungal Biol.*, In press.
- Castro-Pérez, S. M.; R. González-Marín; J. Castaño-Zapata & T. Sanjuán. 2013. Evaluación de Medios de Cultivo para Inducir Esporulación de *Isaria tenuipes* Peck. *Agron.*, 21(1): 19-25.
- Chen, M.; N. Zhou; Z. Li; G.-H. Sung & B. Huang. 2010. *Paecilomyces echinosporus* sp. nov., A Species Isolated from Soil in China. *Mycotaxon*, 114: 25-32.
- Chiriví, J.; G. Danies; R. Sierra; N. Schauer; S. Trenkamp; S. Restrepo & T. Sanjuan. 2017. Metabolomic Profile and Nucleoside Composition of *Cordyceps nidus* sp. nov. (Cordycipitaceae): A New Source of Active Compounds. *PLoS ONE*, 12(6): e0179428.
- Chiriví-Solomón, J. S.; G. Danies; S. Restrepo & T. Sanjuan. 2015. *Lecanicillium sabanense* sp. nov. (Cordycipitaceae) a New Fungal Entomopathogen of Coccids. *Phytotaxa*, 234(1): 063-074.
- Cho, Y. J.; J. P. Park; H. J. Hwang; S. W. Kim; J. W. Choi & J. W. Yun. 2002. Production of Red Pigment by Sumerged Culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35: 195-202.
- Costa S., P. N.; T. L. Bim G.; L. A. Beraldo de M.; L. M. Abreu; L. H. Souza G.; C. Santos; L. Ribero G. & P. Gomes C. 2016. Production and Chemical Characterization of Pigments in Filamentous Fungi. *Microbiology*, 162: 12-22.
- Dong, J. Z.; C. Lei; X. J. Zheng; X. R. Ai; Y. Wang & Q. Wang. 2013. Light Wavelengths Regulate Growth and Active Components of *Cordyceps militaris* Fruit Bodies. *J. Food. Biochem.*, 37: 578-584.
- Dong, J. Z.; M. R. Liu; C. Lei; X. J. Zheng & Y. Wang. 2012. Effects of Selenium and Light Wavelengths on Liquid Culture of *Cordyceps militaris* Link. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 166: 2030-2036.
- Dufossé, L.; M. Fouillaud; Y. Caro; S. Mapari & N. Sutthiwong. 2014. Filamentous Fungi are Large-Scale Producers of Pigments and Colorants for the Food Industry. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 26: 56-61.

- El Basyouni, S. H.; D. Brewer & L. C. Vinning. 1968. Pigments of the Genus *Beauveria*. *Can. J. Bot.*, 46: 441-448.
- Fargues, J.; N. K. Maniania; J. C. Delmas & N. Smits. 1992. Influence de la Température Sur la Croissance *in vitro* d'Hyphomycètes entomopathogènes. *Agronomie*, 12: 557-64.
- Foley, J.; D. Clifford; K. Castle; P. Cryan; & R. S. Ostfeld. 2011. Investigating and Managing the Rapid Emergence of White-Nose Syndrome: A Novel, Fatal, Infectious Disease of Hibernating Bats. *Conserv. Biol.*, 25: 223-231.
- Fredenhagen, A.; P. Hug; H. Sauter & H. H. Peter. 1995. Paecilquinones A, B, C, D, E and F: New Potent Inhibitors of Protein Tyrosine Kinase Produced by *Paecilomyces carneus*. II Characterization and Structure Determination. *J. Antibiot.* 48: 199-204.
- Fuller, K. K.; J. C. Dunlap & J. J. Loros. 2016. Fungal Light Sensing at the Bench and Beyond. *Adv. Genet.*, 96: 01-51.
- Fuller, K. K.; J. J. Loros & J. C. Dunlap. 2014. Fungal Photobiology: Visible Light as a Signal for Stress, Space and Time. *Curr. Genet.*,
- Gmoser, R.; J. A. Ferreira; P. R. Lennartsson & M. J. Taherzadeh. 2017. Filamentous Ascomycetes Fungi as a Source of Natural Pigments. *Fungal Biol. Biotechnol.*, 4(4): 01-25.
- Goettel, M. S.; J. Eilenberg & T. Glare. 2010. Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations. En: Gilbert, L. I. & S. S. Gill (Eds.). *Insect Control: Biological and Synthetic Agents*. Academic Press (Elsevier Ltd.). London, UK. 481 pp.
- Hajek, A. E. & N. V. Meyling. 2018. Fungi. En: Hajek, A. E. & D. I. Shapiro-Ilan (Eds.). *Ecology of Invertebrate Diseases*; First Edition. John Wiley & Sons Ltd. Oxford, UK. 671 pp.
- Heintzen, C. 2012. Plant and Fungal Photopigments. *WIREs Membr. Transp. Signal.*, 1: 411-432.
- Hesketh, H.; H. E. Roy; J. Eilenberg; J. K. Pell & R. S. Hails. 2010. Challenges in Modelling Complexity of Fungal Entomopathogens in Semi-Natural Populations of Insects. *BioControl (Dordr.)*, 55: 55-73.
- Hong, I. P.; S. H. Nam; G. B. Sung; I. M. Chung; H. Hur; M. W. Lee; M. K. Kim & S. X. Guo. 2007. Chemical Components of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson. *Mycobiology*, 35(4): 215-218.
- Humber, R. A. 2012. Identification of Entomopathogenic Fungi. En: Lacey, L. A. (Ed.). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*; Second Edition. Academic Press (Elsevier Ltd.). London, UK. 513 pp.
- Humber, R. A.; L. F. N. Rocha; P. W. Inglis; A. Kipnis & C. Luz. 2013. Morphology and Molecular Taxonomy of *Evlachovaea*-Like Fungi, and the Status of this Unusual Conidial Genus. *Fungal Biol.*, 117: 01-12.
- Hyun, S.-H.; S.-Y. Lee; S. J. Park; D. Y. Kim; Y.-J. Chun; G.-H. Sung; S. H. Kim & H.-K. Choi. 2013. Alteration of Media Composition and Light Conditions Change Morphology, Metabolic Profile, and Beauvericin Biosynthesis in *Cordyceps bassiana* Mycelium. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 23(1): 47-55.
- Inglis, G. D.; J. Enkerly & M. S. Goettel. 2012. Laboratory Techniques Used for Entomopathogenic Fungi: Hypocreales. En: Lacey, L. A (Ed.). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*; Second Edition. Academic Press (Elsevier Ltd.). London, UK. 513 pp.

- Isaka, M.; P. Kittakoop & Y. Thebtaranonth. 2003. Secondary Metabolites of Clavicipitalean Fungi. En: White, J. F.; C. W. Bacon; N. L. Hywel-Jones & J. W. Spatafora (Eds.). *Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impacts*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 591 pp.
- Isaka, M.; P. Kongsaree; & Y. Thebtaranonth. 2001. Bioanthracenes from the Insect Pathogenic Fungus *Cordyceps pseudomilitaris* BCC 1620. II. Structure Elucidation. *J. Antibiot.*, 54: 36-43.
- Jaronski, S. T. 2014. Mass Production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art. En: Morales-Ramos, J.; G. Rojas & D. I. Shapiro-Ilan. *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates y Entomopathogens*. Academic Press (Elsevier Inc.). London, UK. 765 pp.
- Jaronski, S. T. & M. A. Jackson. 2012. Mass Production of Entomopathogenic Hypocreales. En: Lacey, L. A. (E.). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology; Second Edition*. Academic Press (Elsevier Ltd.). London, UK. 513 pp.
- Kamata, N. 2000. Population Dynamics of the Beech Caterpillar, *Syntypistis punctatella*, and Biotic and Abiotic Factors. *Popul. Ecol.*, 42: 267-278.
- Kepler, R. M.; J. J. Luangsa-ard; N. L. Hywel-Jones; C. A. Quandt; G.-H. Sung; S. A. Rehner; M. C. Aime; T. W. Henkel; T. Sanjuan; R. Zare; M. Chen; Z. Li; A. Y. Rossman; J. W. Spatafora & B. Shrestha. 2017. A Phylogenetically-Based Nomenclature for *Cordycipitaceae* (Hypocreales). *IMA Fungus*, 8(2): 335-353.
- Kittakoop, P.; J. Punya; P. Kongsaree; Y. Lertwerawat; A. Jintasirikul; M. Tanticharoen & Y. Thebtaranonth. 1999. Bioactive Naphthoquinones from *Cordyceps unilateralis*. *Phytochemistry*, 52: 453-457.
- Kobayasi, Y. 1941. The Genus *Cordyceps* and its Allies. *Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku*, Sect. B, 5: 53-260.
- Leach, C. M. 1971. A Practical Guide to the Effects of Visible and Ultraviolet Light on Fungi. *Methods in Microbiology*; Vol. 4 En: Booth, C. (Ed.). Academic Press. London, UK. pp. 609-664.
- Liang, Z. 1981. Two New Species of *Paecilomyces* from Insects. *Acta Microbiol. Sin.*, 21: 31-34.
- Lin, B.-Q. & S.-P. Li. 2011. *Cordyceps* as a Herbal Drug. En: Benzie I. F. F. y S. Wachtel-Galor. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects; Second Edition*. Taylor & Francis Group, LLC – CRC Press. New York, USA. 489 pp.
- Lo, H.-Ch.; Ch. Hsieh; L. Chienyan & F.-Y. Lin & T.-H. Hsu. 2013. A Systematic Review of the Mysterious Caterpillar Fungus *Ophiocordyceps sinensis* in Dong-ChongXiaCao and Related Bioactive Ingredients. *J. Tradit. Complement. Med.*, 3(1): 16-32.
- Luangsa-ard, J. J.; N. L. Hywel-Jones; L. Manoch & R. A. Samson. 2005. On the Relationships of *Paecilomyces* Sect. *Isarioidea* Species. *Mycol. Res.*, 109 (5): 581-589.
- Luangsa-ard, J. J.; N. L. Hywel-Jones & R. A. Samson. 2004. The Polyphyletic Nature of *Paecilomyces sensu lato* Based on 18S-Generated rDNA Phylogeny. *Mycologia*, 96: 773-780.
- Mains, E. B. 1958. North American Entomogenous Species of *Cordyceps*. *Mycologia*, 50: 169-222.

- Mar, T. T.; N. Suwannarach; & S. Luyong. 2012. Isolation of Entomopathogenic Fungi from Northern Thailand and their Production in Cereals Grains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 3281-3291.
- Mata-Gómez, L. C.; J. C. Montañez; A. Mendez-Zavala & C. N. Aguilar. 2014. Biotechnological Production of Carotenoids by Yeasts: An Overview. *Microb. Cell Fact.*, 13(12): 01-11.
- McNeill, J.; F. F. Barrie; W. R. Buck; V. Demoulin; W. Greuter; et al. (Eds.). 2012. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Regnum Vegetabile No. 154. Königstein: Koeltz Scientific Books.
- Mena, S. V. 2011. Evaluación de Hongos Entomopatógenos como Potenciales Biocontroladores de la Hormiga Arriera *Atta colombica* (G) del Municipio de Lloró, Chocó. Tesis de Maestría, Universidad Nacional. Santa Fe de Bogotá, Colombia. 90 ppt.
- Mizuno, T. 1999. Medicinal Effects and Utilization of *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes) and *Isaria* Fr. (Mitosporic Fungi) Chinese Caterpillar Fungi, "Tochukaso" (Review). *Int. J. Med. Mushrooms*, 1(3): 251-261.
- Molnar, I.; D. M. Gibson & S. B. Krasnoff. 2010. Secondary Metabolites from Hypocrealean Fungi. *Nat. Prod. Rep.*, 27: 1241-1275.
- Montero, J. J. 2007. Manual para el Manejo de Mariposarios. INbio. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica. 204 pp.
- Morales-Ramos, J. A.; M. G. Rojas & D. I. Shapiro-Ilan (Eds.). 2014. Mass Production of Beneficial Organisms, Invertebrates and Entomopathogens. Academic Press (Elsevier). London, UK. 765 ppt.
- Mukherjee, G. & S. K. Singh. 2011. Purification and Characterization of a New Red Pigment from *Monascus purpureus* in Submerged Fermentation. *Process. Biochem.*, 46: 188-192.
- Mulanovich D. C., A. J. 2007. Mariposas, Guía para el Manejo Sustentable de las Mariposas del Perú. Corporación Gráfica Andina. Lima, Perú. 101 ppt.
- Munsell, A. H. 1929. Munsell Book of Color, Standard Edition. Munsell Color Company, Gretag-Macbeth. New York, USA.
- New, T. R. 2009. Insect Species Conservation. Cambridge University Press. New York, USA. 274 ppt.
- New, T. R. 2014. Lepidoptera and Conservation; First Edition. John Wiley & Sons, Ltd. Oxford, UK. 281 ppt.
- Ng, T. B. & H. X. Wang. 2005. Pharmacological Actions of *Cordyceps*, a Prized Folk Medicine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 57: 1509-1519.
- Nie, S.; S. W. Cui & M. Xie. 2018. Chapter 4 – *Cordyceps* Polysaccharides. En: Nie, S.; S. W. Cui & M. Xie (Eds.). Bioactive Polysaccharides: First Edition. Academic Press (Elsevier Ltd.). London, UK. 566 pp.
- Oh, T.-J.; S.-H. Hyun; S.-G. Lee; Y.-J. Chun; G.-H. Sung & H.-K. Choi. 2014. NMR and GC-MS Based Metabolic Profiling and Free-Radical Scavenging Activities of *Cordyceps pruinosus* Mycelia Cultivated under Different Media and Light Conditions. *PLoS ONE*, 9(3): e90823.

- Olatunji, O. J.; J. Tang; A. Tola; F. Auberon; O. Oluwaniyi & Z. Ouyang. 2018. The Genus *Cordyceps*: An Extensive Review of its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Fitoterapia*, 127: In press.
- Oliveira, A. S.; G. U. L. Braga & D. E. N. Rangel. 2018. *Metarhizium robertsii* Illuminated During Mycelial Growth Produces Conidia with Increased Germination Speed and Virulence. *Fungal Biol.*, 122: 555-562.
- Ortiz-Urquiza, A. & N. O. Keyhani. 2013. Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. *Insects*, 4: 357-374.
- Petersen, F.; A. Fredenhagen; H. Mett; N. B. Lydon; R. Delmendo; H.-B. Jenny & H. H. Peter. 1995. Paecilquinones A, B, C, D, E and F: New Potent Inhibitors of Protein Kinases Produced by *Paecilomyces carneus*. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activity. *J. Antibiot.*, 48: 191-198.
- Pradeep, F. S. & B. V. Pradeep. 2013. Optimization of Pigment and Biomass Production from *Fusarium moniliforme* Under Submerged Fermentation Conditions. *Int. J. Pharm. Pharmaceut. Scis.*, 5(3): 526-535.
- Rangel, D. E. N.; E. K. K. Fernandes; G. U. L. Braga & D. W. Roberts. 2011. Visible Light During Mycelial Growth and Conidiation of *Metarhizium robertsii* Produces Conidia with Increased Stress Tolerance. *FEMS Microbiol. Lett.*, 315: 81-86.
- Rosenblum, E. B.; J. Voyles; T. J. Poorten & J. E. Stajich. 2010. The Deadly Chytrid Fungus: A Story of an Emerging Pathogen. *PLoS Pathogens*, 6: e1000550.
- Samson, R. A. 1974. *Paecilomyces* and Some Allied Hyphomycetes. *Stud. Mycol.*, 6: 1-119.
- Samways, M. J.; M. A. McGeoch & T. R. New. 2010. Insect Conservation: A Handbook of Approaches and Methods. Oxford University Press. New York, USA. 460 ppt.
- Sánchez-Murillo, R. I.; M. Torre-Martínez; J. Aguirre-Linares; A. Herrera-Estrella. 2004. Light-Regulated Asexual Reproduction in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Microbiology*, 150: 311-319.
- Sanjuan, T. 2014. Estudio Filogenético de la Interacción Cordyceps-Insectos en el Noroeste Amazónico: Un Análisis Morfológico, Molecular y Ecológico. Tesis de Doctorado, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 100 ppt.
- Sanjuan, T.; A. E. Franco-Molano; R. M. Kepler; J. W. Spatafora; J. Tabima; A. M. Vasco-Palacios & S. Restrepo. 2015. Five New Species of Entomopathogenic Fungi from the Amazon and Evolution of Neotropical *Ophiocordyceps*. *Fungal Biol.*, In press: 1-16.
- Sanjuan, T.; L. G. Henao & G. Amat. 2001. Distribución Espacial de *Cordyceps* spp. (Ascomycotina: Clavicipitaceae) y su Impacto sobre las Hormigas en Selvas del Piedemonte Amazónico de Colombia. *Rev. Biol. Trop.*, 49(3-4): 945-955.
- Sanjuan T, Tabima J, Restrepo S, Læssøe T, Spatafora JW, Franco AE, 2014. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps sensu stricto*). *Mycologia* 106: 260-275.

- Schuster, A. & M. Schmoll. 2010. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87: 787-799.
- Shim, S. M.; K. R. Lee; S. H. Kim; K. H. Im; J. W. Kim; U. Y. Lee; J. O. Shim; M. W. Lee & T. S. Lee. 2003. The Optimal Culture Conditions Affecting the Mycelial Growth and Fruiting Body Formation of *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycobiology*, 31(4): 214-220.
- Shrestha, B.; E. Tanaka; J.-G. Han; J. Oh; S.-K. Han; K.-H. Lee & G.-H. Sung. 2014. A Brief Chronicle of the Genus *Cordyceps* Fr., the Oldest Valid Genus in Cordycipitaceae (Hypocreales, Ascomycota). *Mycobiology*, 42(2): 93-99.
- Shrestha, B.; E. Tanaka; J.-G. Han; J. Oh; S.-K. Han; K.-H. Lee & G.-H. Sung. 2014. A Brief Chronicle of the Genus *Cordyceps* Fr., the Oldest Valid Genus in Cordycipitaceae (Hypocreales, Ascomycota). *Mycobiology*, 42(2): 93-99.
- Shrestha, B.; E. Tanaka; M. W. Hyun; J.-G. Han; C. S. Kim; J. W. Jo; S.-K. Han; J. Oh & G.-H. Sung. 2016. Coleopteran and Lepidopteran Hosts of the Entomopathogenic Genus *Cordyceps sensu lato*. *J. Mycol.*, 2016: 01-14.
- Shrestha, B.; G.-H. Sung & J.-M. Sung. 2017. Current Nomenclatural Changes in *Cordyceps sensu lato* and its Multidisciplinary Impacts. *Mycology*, 8(4): 293-302.
- Shrestha, B.; S.-K. Choi; H.-K. Kim; T.-W. Kim & J.-M. Sung. 2005. Genetic Analysis of Pigmentation in *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*, 33(3): 125-130.
- Shrestha, B.; W.-H. Lee; S.-K. Han & J.-M. Sung. 2006. Observations on Some of the Mycelial Growth and Pigmentation Characteristics of *Cordyceps militaris* Isolates. *Mycobiology*, 34(2): 83-91.
- Stahl, W. & H. Sies. 2005. Bioactivity and Protective Effects of Natural Carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1740: 101-107.
- Sung, G.-H.; B. Shrestha; S.-K. Han; S.-Y. Kim & J.-M. Sung. 2010. Growth and Cultural Characteristics of *Cordyceps cardinalis* Collected from Korea. *Mycobiology*, 38(4): 274-281.
- Sung, G.-H.; N. L. Hywel-Jones; J.-M. Sung; J. J. Luangsa-ard; B. Shrestha & J. W. Spatafora. 2007. Phylogenetic Classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous Fungi. *Stud. Mycol.*, 57: 05-59.
- Tisch, D. & M. Schmoll. 2010. Light Regulation of Metabolic Pathways in Fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85: 1259-1277.
- Tuli, H. S.; S. S. Sandhu & A. K. Sharma. 2014. Pharmacological and Therapeutic Potential of *Cordyceps* with Special Reference to Cordycepin. 3 Biotech, 4: 1-12.
- Unagul, P.; P. Wongsu; P. Kittakoop; S. Intamas; P. Srikitikulchai & M. Tanticharoen. 2005. Production of Red Pigments by the Insect Pathogenic Fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 135-140.
- Valadon, L. R. G. 1976. Carotenoids as Additional Taxonomic Characters in Fungi: A Review. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 67(1): 1-15.
- Valencia, C. A.; Z. N. Gil y L. M. Constantino. 2005. Mariposas Diurnas de la Zona Cafetera Colombiana, Guía de Campo. Cenicafe. Chinchiná Colombia. 244 págs.

- Vega, F. E.; M. S. Goettel; M. Blackwell; D. Chandler; M. A. Jackson; S. Keller; M. Koike; N. K. Maniania; A. Monzón; B. H. Ownley; J. K. Pell; D. E. N. Rangel & H. E. Roy. 2009. Fungal Entomopathogens: New Insights on their Ecology. *Fungal Ecol.*, 2: 149-159.
- Vega, F. E.; N. V. Meyling; J. J. Luangsa-ard & M. Blackwell. 2012. Fungal Entomopathogens. En: Vega, F. E. & H. K. Kaya (Eds.). Insect Pathology; Second Edition. Academic Press (Elsevier Ltd.). London, UK. 497 pp.
- Villareal, H.; M. Álvarez; S. Córdoba; F. Escobar; G. Fagua; F. Gast; H. Mendoza; M. Ospina y A. M. Umaña. 2004. Manual de Métodos para el Desarrollo de Inventarios de Biodiversidad. Programa de Inventarios de Biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. 236 pp.
- Wat, C.-K.; A. G. McInnes & D. G. Smith. The Yellow Pigments of *Beauverria* Species. Structures of Tenellin and Bassianin. *Can. J. Chem.*, 55: 4090-4098.
- Webster, J. & R. W. S. Weber. 2007. Introduction to Fungi; Third Edition. Cambridge University Press. New York, USA. 895 pp.
- Yang, T. & C. Dong. 2014. Photo Morphogenesis and Photo Response of the Blue-Light Receptor Gene *Cmwc-1* in Different Strains of *Cordyceps militaris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 352: 190-197.
- Yue, K.; M. Ye; Z. Zhou; W. Sun & X. Lin. 2012. The Genus *Cordyceps*: A Chemical and Pharmacological Review. *J. Pharm. Pharmacol.*, 65: 474-493.
- Zalokar, M. 1957. Variations in the Production of Carotenoids in *Neurospora*. *Arch. Biochem. Biophys.* 70: 561-567.
- Zhou, X.; Z. Gong; Y. Su; J. Lin & K. Tang. 2009. *Cordyceps* Fungi: Natural Products, Pharmacological Functions and Developmental Products. *J. Pharm. Pharmacol.*, 61: 279-291.

14. ANEXOS

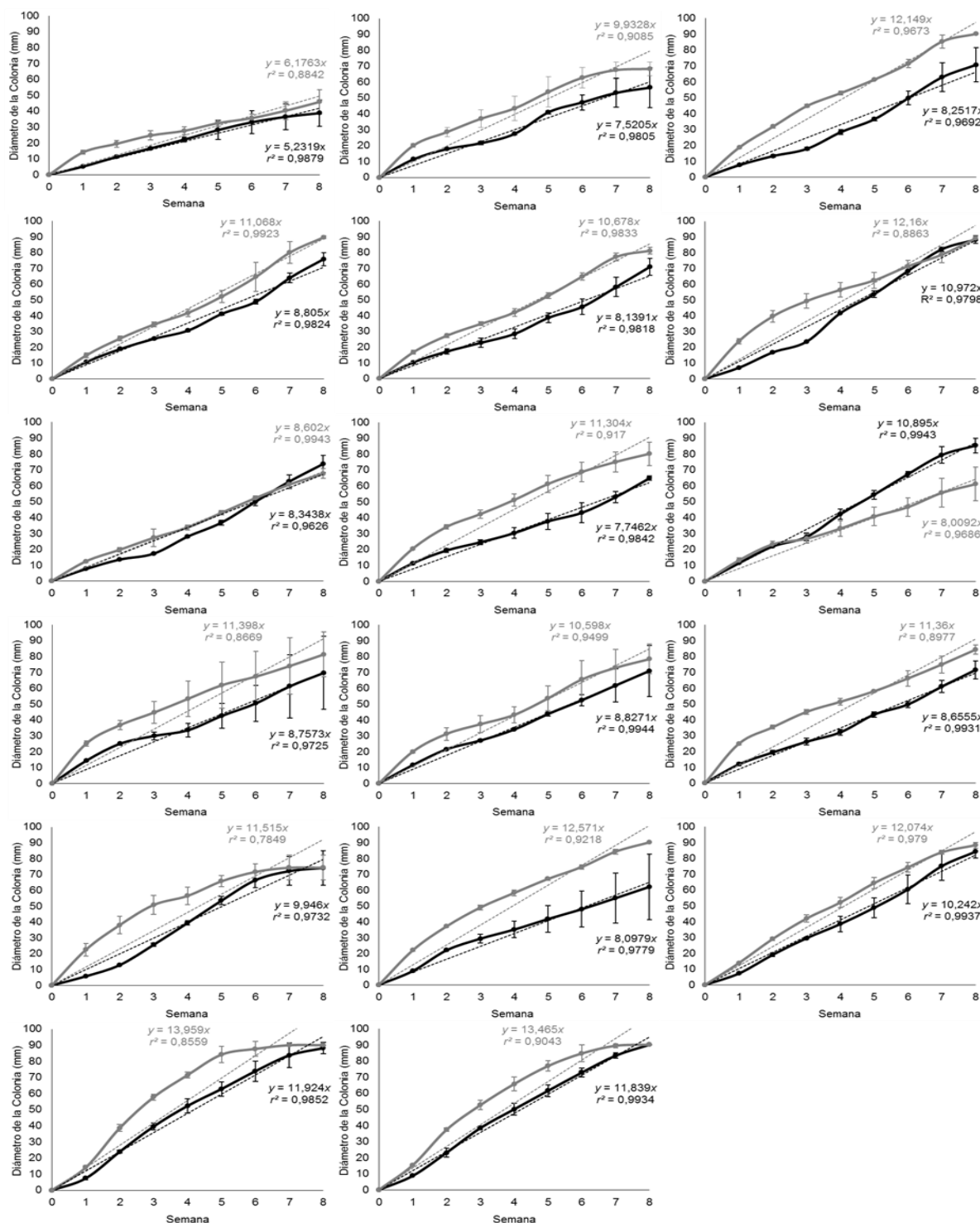


Fig. 15: Crecimiento diametral de las colonias de *Cordyceps* sp. durante ocho semanas de incubación con iluminación y oscuridad constantes en diferentes medios sólidos. En cada gráfica, luz: línea negra, oscuridad: línea gris. Medios (De izquierda a derecha y en orden descendente): WA, PA, MA, MEA, YMA, CDA, PDA, SDA, SDYA, SDMA, YPGA, CDYA, WA+I, SDMA+I, YMA+I, CDA+I, y CDYA+I).